

**Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa**

**Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente**



## **Contribuição para o estudo dos efeitos de descargas orgânicas em peixes**

**Gersilene Dondoya do Sacramento Dias**

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente.

**Orientadora: Prof. Doutora Isabel Peres**

**Lisboa  
2008**

## **Agradecimentos**

À Prof. Doutora Isabel Peres, o meu profundo agradecimento pelos conselhos, orientação e o seu empenho na resolução das dificuldades ao longo do trabalho.

Ao Doutor Mário Dinis, agradeço pelos conselhos, pelas várias sugestões dadas no tratamento estatístico dos resultados, pela disponibilidade demonstrada e também pelo apoio prestado durante todas as fases deste trabalho.

À Dra. Maria do Rosário Duarte, do Centro de documentação e Biblioteca, pela ajuda durante as pesquisas bibliográficas.

À D. Adélia Costa e D. Luísa Caldeira, agradeço o apoio prestado durante a estadia no laboratório.

Ao Ruben, agradeço o apoio prestado durante o ensaio no laboratório de hidráulica.

Aos meus familiares, pelo seu constante apoio e encorajamento.

Por fim, ao meu noivo Carlos Brito, pela ajuda, encorajamento e disponibilidade dispensada ao longo deste trabalho.

## Resumo

O principal objectivo deste trabalho foi avaliar os efeitos resultantes de diferentes tipos de descargas orgânicas, em frentes de descarga e instantâneas, na espécie *Danio rerio*, um peixe de água doce geralmente utilizado para avaliações de toxicidade. Para a simulação das descargas, utilizou-se um efluente sintético, que reproduz, aproximadamente, a composição de uma água residual doméstica, e um canal hidráulico laboratorial. Determinou-se a  $CL_{50}$ , através de testes semi-estáticos, sob condições laboratoriais controladas, ao longo de 96 horas, tendo-se obtido o valor de  $309 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$  (CQO).

Para além de ensaios de dispersão de um corante no canal hidráulico, para melhor percepção do avanço de uma descarga, efectuaram-se ensaios simulando frentes de descarga e descargas instantâneas. Estes ensaios foram realizados com o efluente sintético, em diferentes condições, observando-se a evolução de concentrações no canal e relacionando-as com o comportamento do peixe referido na presença do agente poluente.

Os resultados permitem concluir, através do comportamento observado dos peixes, que a intensidade de resposta, por afastamento ao contacto com a descarga orgânica, varia directamente com a concentração desta no meio, tendo sido possível obter curvas aproximadas para descrição daquela resposta.

Assim, tendo-se constatado que para baixas concentrações a resposta é pouco acentuada, pode inferir-se do risco que lhe poderá estar associado, levando os peixes a permanecerem em situações de contaminação potencial com eventuais efeitos acumulativos.

## Abstract

The main objective of the present work was to assess the effects of different types of organic discharges, instantaneous and by discharge fronts, in exposed *Danio rerio*, a freshwater fish commonly used in toxicity assays. For the discharge simulations was used a synthetic effluent, that approximately reproduces the composition of a domestic sewage and a hydraulic channel. Thus, the LC<sub>50</sub> was determined corresponding to a value of 309 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> (COD), through a series of semi-static tests, under controlled laboratory conditions, over 96 hours.

In a further experiment, using the hydraulic channel, the dispersion of a dye was studied and, to better understand the advancing of a discharge, instantaneous discharges and discharge fronts were simulated. These simulation was made using the synthetic effluent, under different conditions, being observed the evolution of concentrations over the channel and relating those concentrations with the behaviour of the fish in the presence of the pollutant.

The results show, through the behaviour observed in the fish, that the response intensity, by avoiding exposure to the organic discharge, directly varies with the concentration of the discharge on the aquatic environment, having been possible to establish approximate curves that translate this response.

Thus, by being able to observe that for lower concentrations exists lower response, we may infer about the risk associated to these discharges, inducing the fish to remain in situations of potential contamination with probably cumulative effects.

# Índice

<b>1. Introdução</b>	1
1.1 Aspectos gerais sobre a poluição da água	1
1.2. Matéria orgânica e oxigénio dissolvido: poluição orgânica e seus efeitos	3
1.3. Caracterização e principais impactes dos efluentes domésticos	11
1.4. Testes de toxicidade	13
1.5. Objectivos	16
1.6. Plano de trabalho	16
<b>2. Materiais e métodos</b>	17
2.1. Material biológico	17
2.1.1. Peixe-zebra ( <i>Danio rerio</i> )	17
2.1.2. Obtenção e manutenção do peixe-zebra em laboratório	18
2.2. Simulação de um efluente doméstico	19
2.3. Ensaios Biológicos	20
2.3.1. Teste de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i>	20
2.3.2. Ensaios para o estudo do comportamento do <i>Danio rerio</i>	21
<b>3. Resultados e discussão</b>	25
3.1. Teste de toxicidade aguda com D. rerio	25
3.1.1. Caracterização físico-química do efluente	25
3.1.2. Sobrevivência dos animais expostos	26
3.2. Resultados dos testes de mobilidade dos peixes face a uma frente de descarga e uma descarga instantânea	27
<b>4. Conclusões</b>	40
<b>5. Referências bibliográficas</b>	41
<b>6. Anexos</b>	47

## Índice de figuras

Fig. 1.1 – Poluição de um rio com descargas de águas residuais domésticas (fonte: Lacaze, 2000) .....	8
Fig. 1.2 – Descarga no Rio Alviela provocada pela avaria na ETAR de Alcanena (fonte: Jornal O Público).....	9
Fig. 2.1 – Aspecto geral do <i>Danio rerio</i> adulto.....	18
Fig. 2.2 – Sistema de tanques para os ensaios de toxicidade aguda.....	21
Fig. 2.3 – Esquema do canal.....	22
Fig. 2.4 – Visualização do tempo necessário para o corante chegar ao final do canal em frente de descarga e em descarga instantânea .....	24
Fig. 3.1 – Variação da CL e respectivos limites de confiança.....	26
Fig. 3.2 – Evolução da concentração de CQO ao longo do canal, após descarga de um efluente com 2800 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> (teste1) .....	28
Fig. 3.3 – Evolução da concentração de CQO ao longo do canal, após descarga de um efluente com 5600 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> (teste 2) .....	28
Fig. 3.4 – Evolução da concentração de CQO ao longo do canal, após descarga de um efluente com 11200 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> (teste3) .....	29
Fig. 3.5 – Evolução da concentração de CQO ao longo do canal, após uma descarga instantânea de um efluente com 11200 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .....	29
Fig. 3.6 – Comportamento dos peixes face a uma descarga de efluente de 2800 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> e a um fluxo de 0.033 L/min.....	31
Fig. 3.7 – Comportamento dos peixes face a uma descarga de efluente de 5600 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> e um fluxo de 0.239 L/min.....	32
Fig. 3.8 – Comportamento dos peixes face a uma descarga de efluente de 11200 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> e um fluxo de 0.385 L/min.....	32
Fig. 3.9 – Visualização da fuga generalizada dos peixes, originada pela descarga instantânea.....	33
Fig. 3.10 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a frente de descarga de 2800 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .....	33
Fig. 3.11 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a frente de descarga de 5600 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .....	34
Fig. 3.12 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a frente de descarga de 5600 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .....	34
Fig. 3.13 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a frente de descarga de 11200 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .....	35

Fig. 3.14 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a frente de descarga de 11200 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .....	35
Fig. 3.15 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a descarga instantânea de 11200 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .....	36
Fig. 3.16 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a descarga instantânea de 11200 mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .....	36
Fig. 3.17 – Comparação entre o comportamento dos peixes e a concentração de CQO nas frentes de descarga e descarga instantânea .....	38

## Índice de quadros

Quadro 2.1 – Composição do efluente sintético – solução mãe .....	19
Quadro 2.2 – Parâmetros físico-químicos determinados no efluente sintético .....	20
Quadro 2.3 – Ensaio para simulação de frentes de descarga.....	22
Quadro 2.4 – Ensaio de Rodamina (frentes de descarga).....	23
Quadro 2.5 – Ensaio de Rodamina (descargas instantâneas).....	23
Quadro 3.1 – Caracterização físico-química do efluente sintético.....	25
Quadro 3.2 – Caracterização físico-química do efluente utilizado nos ensaios laboratoriais de toxicidade aguda .....	25
Quadro 3.3 – Resultados de CL <sub>50</sub> para <i>D. rerio</i> (IC =Intervalo de confiança).....	26
Quadro 3.4 – Valores de CQO determinados nos compartimentos do canal.....	27
Quadro 3.5 – Caracterização físico-química geral do meio líquido no canal durante os ensaios.....	30
Quadro 3.6 – Comportamento dos peixes face a diferentes gradientes de concentração de matéria orgânico.....	30
Quadro 3.7 – % de indivíduos que se deslocaram para o extremo jusante de cada compartimento.....	31
Quadro 3.8 – % de indivíduos que se deslocam para o extremo jusante de cada compartimento (descargas instantâneas).....	31
Quadro 3.9 – Variação do comportamento dos peixes em função da concentração no meio (frente de descarga).....	37
Quadro 3.10 – Variação do comportamento dos peixes em função da concentração no meio (descarga instantânea ).....	38



# **1. Introdução**

## **1. 1. Aspectos gerais sobre a poluição da água**

A água é, não só, essencial para a sobrevivência dos organismos vivos, como constitui também um meio de interface e troca constante entre o biota e o meio, sendo os correspondentes fluxos materiais fundamentais para o equilíbrio do Ambiente. Os ecossistemas aquáticos são sistemas abertos, sendo portanto bastante vulneráveis a agressões exteriores (Andrade, 2004). O desenvolvimento industrial, o crescimento demográfico, com concentrações populacionais elevadas nos grandes centros urbanos e o contínuo aumento dos usos da água, sem adequada restituição aos meios receptores, têm causado impactes muito preocupantes, nalguns casos irreversíveis.

Embora se possa admitir que a quantidade de água numa bacia hidrográfica se mantém constante no tempo, no entanto, muitas vezes a procura por água aumenta com a mudança das actividades humanas causadoras de poluição e constata-se, normalmente, uma redução significativa de disponibilidades hídricas, com consequências para o homem e para os ecossistemas em geral (Kithiia, 1997).

A acção antrópica pode provocar alterações, directa ou indirectamente, sobre o ambiente aquático com consequências negativas para os cursos de água que ficam expostos a diversas fontes de poluição e/ou alterações físicas que podem constituir um risco para a saúde humana e ter implicações ao nível socio-económico como, por exemplo, a inutilização de uma massa de água para fins recreativos. (Lacaze, 2000).

Deste modo, torna-se essencial, a determinação da toxicidade de inúmeros compostos químicos e respectivos produtos de degradação, usualmente utilizados para diversos fins industriais, agrícolas e domésticos, que frequentemente são descarregados nos cursos de água e para os quais se desconhecem os efeitos nos organismos. Essa determinação visa minimizar a ocorrência de descargas de compostos poluentes perigosos, através do estabelecimento de

listas de substâncias poluentes prioritárias e implementação de planos estratégicos para a sua redução no Ambiente. Nesse sentido, associam-se programas de monitorização da qualidade da água que visam a preservação da vida aquática e dos respectivos ecossistemas.

No passado, a preocupação no tratamento de águas residuais urbanas e industriais centrava-se na redução dos poluentes consumidores de oxigénio, enquanto actualmente, visa sobretudo acautelar problemas de saúde pública (Blum e Speece, 1990).

Os compostos tóxicos podem revelar os seus efeitos adversos de diversas maneiras, dependendo das características do poluente, do meio aquático receptor e das respectivas comunidades biológicas (Andrade, 2004). Assim, para além das análises físico-químicas tradicionais é fundamental complementar essa informação com dados de natureza ecológica e biológica, relativos à estrutura das biocenoses e à avaliação da toxicidade dos poluentes (Rand, 1995).

Em muitas situações, águas contaminadas são frequentemente lançadas directamente no solo ou descarregadas nos meios aquáticos sem qualquer tipo de tratamento. Contudo, qualquer mudança na qualidade da água, devida a descargas deliberadas ou acidentais de compostos químicos oriundos de águas residuais municipais, industriais ou agrícolas, podem interferir com a homeostasia dos organismos presentes no meio. Tais interferências podem manifestar-se a diversos níveis: bioquímico, celular, dos órgãos e/ou do indivíduo, podendo ocorrer alterações ao nível do crescimento, reprodução e sobrevivência, devido à alteração da fisiologia normal dos organismos aquáticos, o que pode traduzir-se em mudanças na estrutura e funcionamento dos ecossistemas (Sponza, 2002).

A toxicidade dos compostos químicos pode ser avaliada em diversos organismos vivos através da análise de biomarcadores específicos que são induzidos como resposta à exposição a um determinado composto. Um biomarcador define-se como uma resposta bioquímica, fisiológica, celular, morfológica ou comportamental ao nível de um organismo exposto a

concentrações subletais de poluentes (Andrade, 2004). Considerando os fenómenos de persistência e bioacumulação de poluentes tóxicos a longo prazo na cadeia alimentar, os problemas decorrentes de efeitos tóxicos nos ecossistemas aquáticos podem não se restringir apenas aos desequilíbrios ecológicos provocados nas massas de água, visto que também podem afectar, a saúde humana (Lacaze, 2000). A nível comportamental, saliente-se que a percepção de poluentes pode levar à fuga dos organismos de modo a evitar o contacto com aquele estímulo. No entanto, a tendência de comportamento de fuga é uma das primeiras a sofrer alterações, através de inibição da actividade locomotora, devido à acção dos compostos químicos sobre o sistema neuro-endócrino (Lacaze, 2000).

### **1.2. Matéria orgânica e oxigénio dissolvido: poluição orgânica e seus efeitos**

Por definição, designa-se como matéria orgânica, todos os compostos em cuja formulação química, existe simultaneamente, carbono, hidrogénio e oxigénio, juntamente com azoto nalguns casos. Poderão existir também outros elementos como fósforo, enxofre, ferro e cobalto em pequenas quantidades, bem como detergentes, pesticidas e herbicidas (Pacheco, 2007). Os detergentes são um dos principais poluentes que se encontram nas águas residuais urbanas, porque para além da sua toxicidade, contêm fósforo, um nutriente que quando se encontra em excesso nas águas favorece a eutrofização.

A maioria dos organismos depende do oxigénio para a manutenção dos processos metabólicos que produzem energia para o crescimento e reprodução, sendo os processos aeróbios os mais importantes, dadas as suas necessidades de oxigénio livre. O oxigénio e o azoto, ao contrário de outros gases atmosféricos, são pouco solúveis em água e, visto não reagirem quimicamente com a água, a sua solubilidade é directamente proporcional às pressões parciais nas fases líquida e gasosa. Para além disso, a sua solubilidade depende de outras características como a temperatura, que aumenta a velocidade das reacções bioquímicas, reflectindo-se numa maior necessidade de oxigénio (Svobodová et al., 1993).

Os níveis de oxigénio na água dependem do balanço entre a entrada via atmosfera e plantas, e o seu consumo pelos organismos vivos. A entrada via atmosfera depende da turbulência da interface ar-água e a deficiência de oxigénio na água. Por outro lado, os “inputs” das plantas dependem da actividade fotossintética, a qual aumenta com a temperatura e luz solar, podendo o excesso de oxigénio ser perdido para a atmosfera. O consumo de oxigénio também depende da respiração dos organismos aquáticos, incluindo plantas, e da decomposição aeróbia de material pelas bactérias, cujas taxas também aumentam com a temperatura (Svobodová et al., 1993).

O oxigénio dissolvido é um dos parâmetros mais importantes para o controlo de poluição da água, uma vez que permite a avaliação das condições aeróbias de um curso de água que recebe descargas de poluentes. A solubilidade do oxigénio é função da temperatura e da altitude local, sendo a sua dissolução numa massa de água dependente principalmente das condições de turbulência das águas. Um baixo conteúdo de oxigénio dissolvido indica a presença de condições oxidativas, tais como matéria orgânica biodegradável e iões em baixo estado de oxidação, por exemplo,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  (Jordão et al., 2001).

O aumento da temperatura não apenas dificulta a dissolução do oxigénio na água como aumenta o seu consumo (através da respiração dos organismos e da decomposição da matéria orgânica). O défice de oxigénio cresce significativamente quando grande quantidade de águas residuais é descarregada *in natura* no meio aquático, dada a intensa actividade microbiológica que provocam. As deficiências de oxigénio causam asfixia dos peixes, com efeitos que poderão variar com a capacidade de adaptação das espécies.

Segundo Svobodová et al. (1993), peixes expostos a uma água com deficiência de oxigénio, reduzem ou param de se alimentar, mantendo-se à superfície para tentar respirar (ex: ciprinídeos), ou permanecem junto à entrada de água para o lago onde os níveis de oxigénio são mais elevados, ficando tórpidos sem reagir à irritação, podendo perder a sua capacidade

de fugir a capturas ou mesmo morrer. As maiores alterações morfológicas incluem uma coloração pálida da pele, congestionamento do sangue cianótico nas brânquias, adesão das lamelas das brânquias e pequenas hemorragias na região anterior da cavidade ocular e da pele que cobre as brânquias. Na maioria de peixes predadores a boca abre-se espasmodicamente e o opérculo sobre as brânquias permanece aberto.

A poluição da água pode induzir mudanças histopatológicas nos peixes, que podem constituir indicadores da exposição a poluentes. A histologia representa uma ferramenta útil na avaliação do grau de poluição, particularmente para efeitos subletais e crónicos. Dadas as funções das brânquias como respiração, osmoregulação, excreção de resíduos azotados e equilíbrio ácido-base, o seu estudo histopatológico permite considerá-las como marcadores primários de poluição aquática. Assim, a perda funcional das brânquias provocada por diversos tipos de poluentes, afecta seriamente a saúde dos peixes. Por esta razão, as brânquias são consideradas um dos indicadores mais adequados para avaliar os níveis de poluição da água, uma vez que são o alvo principal para a acção tóxica de poluentes químicos (Cengiz e Unlu, 2003; Schwaiger, 2001).

Um dos tipos de poluição mais comuns dos cursos de água é o resultante de descargas de efluentes domésticos, com grandes volumes de matéria orgânica, que levam à redução do oxigénio dissolvido, criando-se condições sépticas (Odum, 2001). Deste modo, é possível determinar o grau de poluição orgânica das águas naturais através de testes não específicos que fornecem uma indicação indirecta da quantidade de matéria orgânica presente nessa água, nomeadamente CBO (carência bioquímica de oxigénio) e CQO (carência química de oxigénio) (Boavida, 2001).

A concentração de um efluente orgânico é geralmente expressa em termos da sua CBO, a qual se define como sendo a quantidade de oxigénio, expressa em  $\text{mg.L}^{-1}$ , utilizada pelo efluente durante a degradação microbiana do seu conteúdo orgânico. Este método pressupõe que o

oxigénio é principalmente consumido por microrganismos aeróbios durante o metabolismo da matéria orgânica, o que não é necessariamente verdade, uma vez que vários efluentes contêm compostos quimicamente reduzidos, com oxidação originada de processos puramente químicos. Por este motivo é geralmente necessário levar a cabo outras determinações para além da CBO, por exemplo a CQO de modo a caracterizar correctamente os efeitos de um efluente ou para interpretar melhor um determinado valor de CBO. Apesar destas limitações, os valores de CBO são geralmente úteis como indicadores da carga orgânica de uma determinada água (Abel, 1989).

Numa água não poluída, a sua quantidade relativamente reduzida de matéria orgânica é rapidamente assimilada pelo biota, sendo incorporada na sua biomassa e também decomposta por bactérias e fungos. Na actividade metabólica dos microrganismos é também consumido oxigénio, embora nos locais em que a carga orgânica é baixa, o oxigénio removido seja rapidamente repostado por fotossíntese e re-arejamento atmosférico. Todos os sistemas aquáticos são capazes de absorver uma certa quantidade de poluição orgânica sem que isso lhes cause prejuízos significativos, através dos organismos que compõem a sua estrutura trófica, que materializam a sua capacidade de auto-depuração. Só depois de ultrapassados os limites de auto-depuração é que a água começa a apresentar sinais de poluição, começando a vida animal e vegetal a ser afectada.

Em locais onde o “input” de matéria orgânica excede a capacidade do sistema para a assimilar, ocorre um número elevado de alterações, numa sequência determinada de acordo com a severidade da carga orgânica e as características físicas da água receptora. Inicialmente, o nível de matéria orgânica estimulará uma maior actividade dos organismos decompositores. No entanto, quando a sua taxa de consumo de oxigénio ultrapassar a taxa de re-arejamento da água, a concentração de oxigénio dissolvido baixará (Abel, 1989).

Consideram-se três tipos gerais de poluição das águas: poluição orgânica, poluição microbiana e poluição inorgânica. Este trabalho incide apenas sobre poluição orgânica. Neste caso, o mecanismo de auto-depuração consiste na mineralização das substâncias orgânicas para reciclagem dos diversos elementos necessários à vida (essencialmente C, N, S e P). À medida que o processo de regeneração decorre, aumenta a diversidade biótica e vão ressurgindo pouco a pouco os organismos mais sensíveis, que haviam desaparecido com a descarga de poluentes. Contudo a questão coloca-se em saber até que ponto os sistemas aquáticos conseguem recuperar face aos distúrbios causados (Gaivão, 1985).

Por si só, os distúrbios provocados pela poluição orgânica são suficientes para eliminar algumas espécies e, conseqüentemente provocar a morte dos animais que destes se alimentavam e assim sucessivamente, os quais podem ou não ser substituídas por outros com menores exigências de oxigénio, enquanto que outras espécies são eliminadas pelos produtos tóxicos presentes (sulfuretos, amónia), ou por colmatagem dos locais de abrigo e redução da diversidade de habitats. Se a redução de oxigénio for demasiado severa, os decompositores aeróbios deixarão de poder manter a sua actividade e organismos anaeróbios tornar-se-ão predominantes. Na Figura 1.1 representa-se a poluição de um rio com águas residuais não tratadas e subsequente recuperação, reflectida pelas alterações na comunidade biótica.

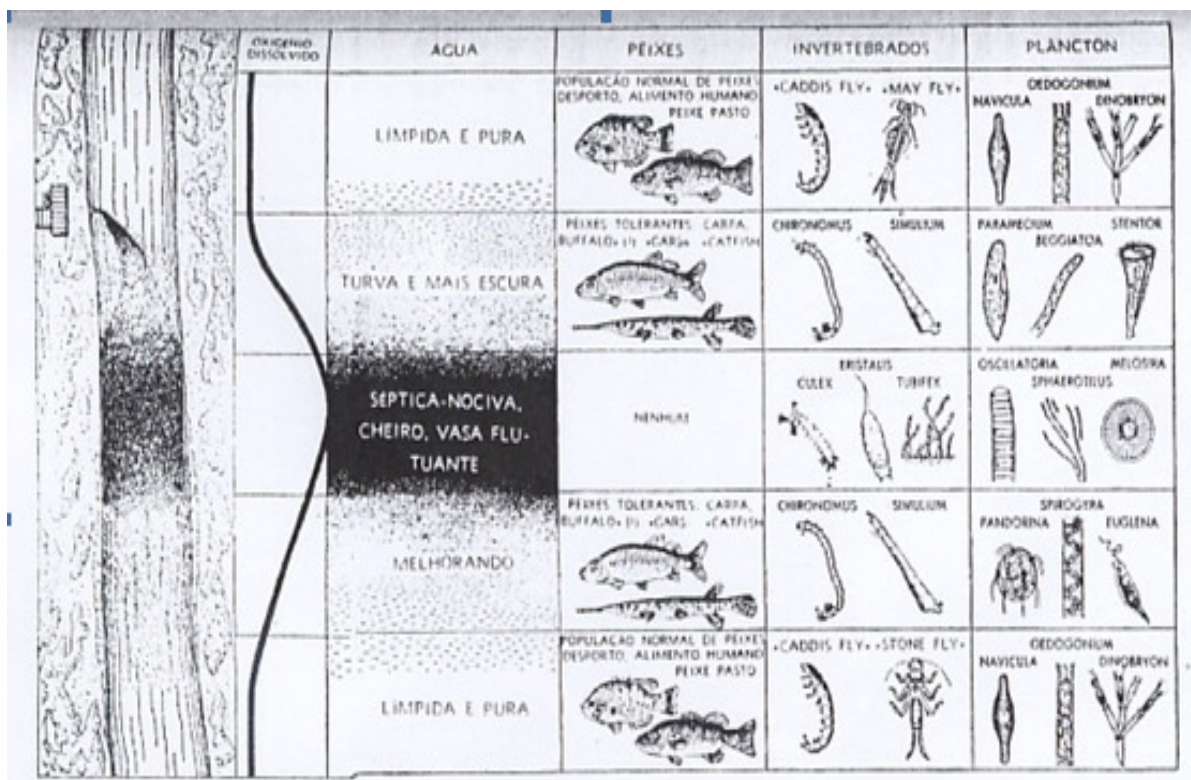


Fig. 1.1 – Poluição de um rio com descargas de águas residuais domésticas (fonte: Lacaze, 2000)

Diferentes espécies de peixes têm diferentes exigências de oxigênio dissolvido na água. Os salmonídeos apresentam uma maior exigência, com uma concentração ideal entre 8 a 10 mg.L<sup>-1</sup>. Contudo, se esta concentração descer abaixo dos 3 mg.L<sup>-1</sup>, começam a observar-se sinais de asfixia. Os ciprinídeos são menos exigentes, conseguindo sobreviver em águas contendo entre 6 a 8 mg.L<sup>-1</sup>, observando-se sinais de asfixia apenas quando a concentração de oxigênio desce para 1,5 a 2 mg.L<sup>-1</sup>. O limite superior de CQO, óptimo para ciprinídeos, em lagos ou rios, é de 20 a 30 mg O<sub>2</sub>. L<sup>-1</sup> e o correspondente limite de CBO<sub>5</sub> é de 8 a 15 mg O<sub>2</sub>. L<sup>-1</sup>. As exigências de oxigênio dos peixes também dependem de outros factores, incluindo temperatura, pH, níveis de CO<sub>2</sub> e da taxa metabólica dos peixes (Svobodová et al., 1993).

A redução das populações de peixes como efeito da poluição implica também a diminuição do número dos animais que se alimentam dos peixes, tais como aves e alguns mamíferos (por exemplo, as lontras) podendo levar, em última análise, ao colapso da cadeia trófica e consequentemente do próprio ecossistema. (Abel, 1989). A extensão dos efeitos adversos



sobre o biota aquático varia em função do tipo e quantidade dos poluentes e das características dos meios hídricos receptores (Hynes, 1960; Gaivão, 1985, Odum, 2001).

Descargas orgânicas biodegradáveis originárias de águas residuais industriais e domésticas não tratadas ou com tratamento inadequado, são, presentemente, uma das causas principais da deterioração de sistemas aquáticos. O principal dano ecológico resultante da introdução de matéria orgânica biodegradável na água é o consumo do oxigénio dissolvido (levando a que o impacte das descargas seja mais pronunciado no ponto de descarga), originando uma redução do teor de oxigénio e desse modo, interferindo com a população de peixes, causando morte e anormalidades nos descendentes (Jordão et al., 2001; Amazu, 1997). Na Figura 1.2 representa-se o efeito agudo de uma descarga de águas residuais na comunidade aquática.



Fig. 1.2 – Descarga no Rio Alviela provocada pela avaria na ETAR de Alcanena (fonte: Jornal O Público)

Devido à sua acessibilidade, os ecossistemas aquáticos, tanto dulçaquícolas como litorais, têm sido dos mais afectados no que diz respeito à poluição orgânica, devido sobretudo a serem utilizados como receptores de descargas não controladas.

Em cada massa de água, como em qualquer ecossistema, estabelece-se um equilíbrio entre a comunidade biótica e as condições ambientais predominantes (Odum, 2001). A população de cada espécie dentro da comunidade só pode existir se a intensidade de cada factor ambiental se incluir dentro de certos limites críticos. As maiores produtividades bióticas são asseguradas por uma combinação óptima do conjunto desses factores ambientais. São exemplos importantes, o teor de oxigénio dissolvido na água, a concentração em nutrientes, a intensidade luminosa, a temperatura, o tipo de substrato, a predação e competições biológicas.

Por sua vez, os organismos interagem com os meios onde vivem e modificam-no através das suas actividades metabólicas. As alterações num ecossistema podem ocorrer naturalmente, como por exemplo no caso da eutrofização gradual de um lago. No entanto, as alterações provocadas por descargas de qualquer substância, variação de temperatura no ambiente, são consideradas como poluição quando essas substâncias, pela sua quantidade, causam danos nos recursos naturais e, extensivamente, têm repercussões negativas no bem-estar e saúde do Homem (Hynes, 1960). Os efeitos de poluição orgânica variam de caso para caso, dependendo da composição e quantidade dos efluentes e das características do sistema hídrico em causa (Gaivão, 1985).

A poluição orgânica pode provocar:

- Turvação causada pela matéria em suspensão, que reduz a penetração da luz e, consequentemente, a taxa fotossintética;
- Colmatagem e sedimentação de fundos, impedindo a vida de muito as espécies por asfixia e falta de locais para abrigo e desenvolvimento de posturas;
- Descida do teor de oxigénio dissolvido, por vezes até à completa exaustão, devido ao consumo nos processos oxidativos da decomposição da matéria orgânica;
- Enriquecimento em nutrientes inorgânicos (iões e sais minerais) que podem provocar eutrofização com todas as suas consequências (produção em excesso de plantas

verdes, turvação e putrefacção causadas por esse excesso, grandes variações no teor de oxigénio dissolvido, variações de velocidade das correntes e aumento da sedimentação);

- Adição de produtos tóxicos, como a amónia ou sulfuretos, quando a reciclagem dos nutrientes, por desoxigenação total, se processa em fase anaeróbia.

### **1.3. Caracterização e principais impactes dos efluentes domésticos**

As águas residuais domésticas provêm principalmente, de habitações, edifícios públicos e comerciais que concentram aparelhos sanitários, lavandarias e cozinhas. Apesar de variarem em função dos costumes e condições socio-económicas das populações, os esgotos domésticos têm características bem definidas, resultantes do uso da água em função dos hábitos de higiene e das suas necessidades fisiológicas. As águas residuais domésticas são constituídas, basicamente, por águas de banho, urina, fezes, restos de comida, sabão, detergentes e águas de lavagem. São constituídas por cerca de 97 % de água e 3 % de detritos orgânicos, nutrientes (nomeadamente azoto e fósforo), detergentes e gorduras, servindo de substrato para uma variedade de microrganismos, nomeadamente vírus e bactérias. Os 3% referentes a sólidos são constituídos por 70% de sólidos orgânicos (proteínas, carbo-hidratos, gorduras) e 30 % sólidos inorgânicos (areia, sais e metais) (Abel, 1989; Azevedo, 2003; Tebbutt, 1998; Amuzu, 1997).

Deste modo, os efluentes domésticos são fundamentalmente constituídos por matéria orgânica e mineral, em solução e em suspensão, assim como por uma elevada quantidade de bactérias e outros organismos patogénicos e não patogénicos, pelo que a sua composição normalmente leva a enriquecimento em nutrientes, depleção de oxigénio e a um aumento de poluição bacteriana nas águas superficiais. Tal eutrofização pode causar uma perturbação na biodiversidade. (Kithiia e Ongwenyi, 1997).

A gestão da poluição provocada por águas residuais domésticas centra-se, para além da matéria orgânica, nas concentrações de azoto, principalmente devido aos múltiplos impactes ecológicos que podem provocar nos meios receptores (Nixon e Buckley, 2002; Scavia e Bricker, 2006) e representando uma importante contribuição para o balanço de azoto nos sistemas aquáticos à escala global (Turner et al. 2003). Os impactes dos compostos químicos presentes nas águas residuais no biota aquático são diversos e foram identificados em todos os níveis da organização ecológica, incluindo nomeadamente: alterações patológicas do tecido (Moore et al., 2003), estrogenicidade e outros distúrbios endócrinos (Jobling and Tyler, 2003), alterações na dinâmica das populações expostas, mudanças no espectro da produção e do tamanho do corpo de comunidades e redução na flora aquática com efeitos negativos sobre as cadeias alimentares (Breitburg, 2002; Schlacher, 2005).

O azoto é um agente importante na alteração ecológica das águas costeiras (Nixon e Buckley, 2002), incluindo efeitos dramáticos tais como a eutrofização a larga escala, *blooms* de algas prejudiciais, hipoxia e/ ou anoxia (Breitburg, 2002). Estes fenómenos podem também verificar-se nos estuários ou em águas interiores.

A descarga de águas residuais provenientes de uma estação de tratamento poder ter um impacte negativo na saúde dos peixes pelo aumento das respostas ao *stress*, as quais podem ser cumulativas. O efluente proveniente da estação não só representa um factor de stress adicional, mas também deteriora a qualidade da água ao aumentar as concentrações de substâncias prejudiciais ao biota (Bernet et al., 2000; Bernet et al., 2001; Miller et al., 2004), sendo que, o efluente tratado proveniente das estações de tratamento pode também conter níveis relevantes de estrogénios para os peixes expostos, os quais podem levar a disrupção endócrina e disfunção reprodutiva (Diniz et al., 2004).

Os peixes desempenham um papel ecológico fundamental nos ecossistemas aquáticos e, além disso, são fontes de recursos proteicos de alta qualidade para alimentação humana. São

também bons indicadores de contaminação sendo, por esse motivo, amplamente utilizados em ensaios de avaliação da toxicidade de efluentes (Abel, 1989; Barbier, 2003).

#### **1.4. Testes de toxicidade**

A toxicologia aquática tem sido definida como o estudo dos efeitos de químicos ou outros agentes tóxicos em organismos aquáticos, com especial ênfase nos efeitos nocivos (Andrade, 2004).

Utilizam-se testes de toxicidade para estimar os efeitos provenientes da exposição a químicos, tais como alterações na mortalidade, crescimento, reprodução, patologias, comportamento, fisiologia e bioquímica dos organismos e, consequentemente, estimar as concentrações e durações de exposição necessárias para provocar efeitos críticos. Os dados recolhidos através destes testes permitem alimentar bases de dados que podem ser utilizadas para avaliar o risco associado a uma situação onde é definido o agente químico, o organismo e as condições de exposição (Rand, 1995).

A maior parte dos ensaios de toxicidade são conduzidos em laboratório, fornecendo resultados a partir dos quais se tentam extrapolar prováveis situações reais adversas. Em alguns casos as relações de causa e efeito poderão ser estabelecidas a partir destes testes, devido ao elevado grau de controlo das condições de teste (e.g. qualidade da água, fotoperíodo, temperatura). Além disso, estes testes são relativamente simples de conduzir, estando já a maior parte padronizada, podendo ser reproduzidos de forma fiável.

Em geral, nos ensaios toxicológicos são usadas espécies consideradas representativas da maioria das classes de organismos, de modo a que os resultados possam proporcionar informação sobre a toxicidade de químicos específicos para diferentes tipos de organismos, sob determinadas condições (Rand, 1995) ou sobre o próprio ecossistema (Blum e Speece, 1990).

Na realização de ensaios de toxicidade, os organismos são expostos a diferentes concentrações do composto a testar, sendo os critérios de determinação dos efeitos previamente estabelecidos (e.g. sobrevivência, crescimento, malformações), procedendo-se simultaneamente à comparação com os organismos de controlo.

Os ensaios agudos são realizados geralmente em períodos de 48 a 96 horas e os efeitos críticos analisados são normalmente a mortalidade ou a imobilização dos organismos. Estes testes são relativamente simples e de baixo custo, o que explica que uma grande parte de informação já existente, no que diz respeito à avaliação da toxicidade de efluentes, seja proporcionada por este tipo de testes, que têm como objectivo a determinação da concentração de uma substância (química ou efluente) ou a intensidade de um agente (e.g. temperatura, pH) que produz um efeito prejudicial num grupo de organismos durante uma exposição curta, efectuada em condições controladas (USEPA, 1996).

A concentração letal média ( $CL_{50}$ ) expressa-se pelo valor da concentração do agente tóxico que provoca 50% de mortalidade dos organismos expostos, nas condições experimentais utilizadas (USEPA, 1996), podendo ser extrapolada para uma população.

Os ensaios de toxicidade vêm sendo cada vez mais utilizados para determinação de efeitos nocivos em organismos aquáticos, em virtude, principalmente, do risco potencial de transferência de poluentes do ambiente para os organismos e dos efeitos na qualidade da água. Uma vez que a percepção de “poluição”, na maioria das vezes, é baseada em sinais biológicos seria lógico que a monitorização ambiental fosse principalmente baseada em medições biológicas, para além das físico-químicas (Whitelaw e Solbé, 1989).

No que diz respeito às limitações dos referidos testes, existe uma grande dificuldade de extrapolação dos resultados laboratoriais para o ambiente natural, uma vez que os efeitos observados em laboratório podem não ocorrer da mesma forma, ou com o mesmo nível e

intensidade, para concentrações similares em ambiente natural. Os efeitos observados em laboratório podem ser mais nocivos do que no ambiente natural, pois no laboratório não se tem em consideração a capacidade de adaptação dos organismos. Além disso, os estudos laboratoriais não conseguem simular as complexas interações entre espécies, assim como a influência de alterações do meio ambiente que ocorrem espontaneamente nos sistemas naturais (Andrade, 2004).

A variabilidade dos testes de toxicidade e as diferenças nas espécies podem originar também incertezas na interpretação dos resultados. Mas, apesar das limitações dos testes, os seus resultados fornecem informações importantes sobre a avaliação ecotoxicológica de locais contaminados. Segundo Fent (2003), estes testes realizados em laboratórios são uma ferramenta viável na caracterização da acção tóxica dos compostos químicos e na compreensão da toxicidade associada, sendo que no futuro a avaliação de locais contaminados deve ser baseada em avaliações biológicas significativas para além das actuais análises químicas.

A toxicidade das águas residuais domésticas raramente está associada a um único elemento ou substância tóxica, mas a todo um conjunto de compostos que interagem entre si, apresentando efeitos sinérgicos, antagónicos e/ou aditivos.

### **1.5. Objectivos**

O presente trabalho teve por objectivo estudar o comportamento de peixes face a episódios de poluição orgânica, materializados por frentes de descarga e descargas instantâneas, por forma a disponibilizar informação para a avaliação de impactes ambientais.

### **1.6. Plano de trabalho**

O desenvolvimento do trabalho incluiu quatro fases:

1. Avaliação dos níveis de tolerância do material biológico (peixes) utilizado para uma mistura química, simulando água residual doméstica, através da determinação da  $CL_{50}$ ;
2. Com base nos valores da  $CL_{50}$ , estudou-se o comportamento de peixes face a frentes de descarga, por simulação em canal hidráulico;
3. De modo semelhante à fase anterior, estudou-se o comportamento dos peixes para descargas instantâneas;
4. Procedeu-se à integração dos resultados obtidos nas fases anteriores, procurando-se obter informação para uso em avaliação de impactes ambientais.



## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Material biológico

#### 2.1.1. Peixe-zebra (*Danio rerio*)

Os peixes são componentes importantes dos ecossistemas de água doce e o seu uso em testes ecotoxicológicos é recomendado pelas normas da OCDE e USEPA (1996). A aplicação de peixes como indicadores biológicos da condição ecológica de estuários e rios é baseada na sensibilidade dos peixes a alterações da qualidade da água, à qualidade e disponibilidade do habitat e à intensidade da exploração de pescas. (Leamon et al., 2000; Harrison e Whitfield, 2004; Breine et al., 2007; Whitfield e Elliot, 2002).

No presente trabalho foi utilizado o peixe zebra (*Danio rerio*), um peixe tropical pertencente à classe Actinopterygii, à ordem Cypriniformes e à família dos ciprinídeos. É uma espécie bentopelágica de água doce, com condições ótimas de temperatura, entre 18 e 24 °C, pH entre 6 e 8 (Westerfield, 2000). É um peixe de aquário muito popular, de pouca profundidade e que normalmente habita em correntes, canais, lagos, lagoas, diques e massas de água com baixa velocidade ou estagnadas, incluindo arrozais.

O seu nome comum advém das 5 riscas azuis uniformes e pigmentadas ao longo do seu corpo (zonas laterais e as barbatanas) até ao extremo da cauda. Tem o dorso verde azeitona, as zonas laterais e ventral dourado-prateado, bem como a barbatana dorsal debruada a branco. O peixe zebra atinge um comprimento de cerca de 4 a 6 cm e vive cerca de 5 anos. É uma espécie simples de se obter, económica, de fácil manutenção e que sob condições apropriadas consegue proporcionar um grande número de ovos transparentes e não aderentes e de fácil manuseamento. Uma fêmea produz cerca de 50 a 200 ovos por dia.

Os factores que o tornaram tão popular na aquariofilia (elevada resistência, baixo custo de manutenção, pouco espaço necessário, entre outros) foram os mesmos que o converteram numa das espécies mais utilizadas em investigação, tendo sido estabelecido como organismo

modelo, com o trabalho pioneiro nos anos 70, realizado por George Streisinger, na Universidade do Oregon (Hawthorne, 2001), sobre o modo como as mutações genéticas afectam o desenvolvimento do sistema nervoso nos vertebrados.

Devido às suas características, o *Danio rerio* tem sido bastante utilizado como organismo modelo em inúmeros estudos. É considerado uma espécie padrão em toxicologia, sendo recomendada como organismo teste em protocolos internacionais (USEPA, 1996). Na Figura 2.1 mostra-se o aspecto geral do *D. rerio*.

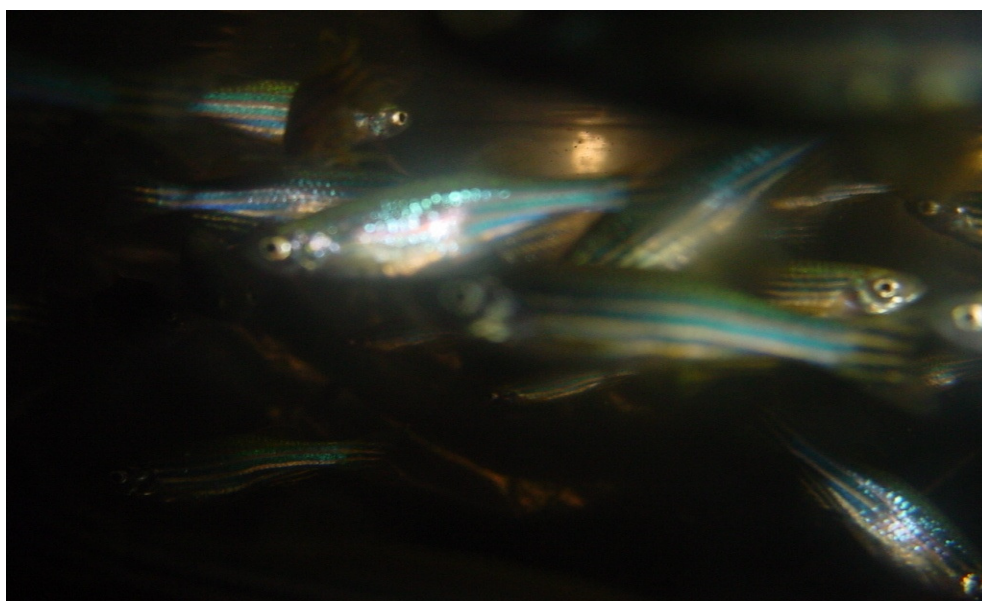


Fig. 2.1 – Aspecto geral do *Danio rerio* adulto

#### 2.1.2. Obtenção e manutenção do peixe-zebra em laboratório

Foram utilizados peixes *Danio rerio* adultos, obtidos a partir de um fornecedor comercial (Mil Aquários). Os peixes foram aclimatados em laboratório durante sete dias, em aquários com água de rede pública, com remoção prévia de cloro e um sistema de filtragem, recirculação e arejamento contínuo, sendo mantidos numa faixa de temperatura de aproximadamente 18 a 20 °C e estando sujeitos a um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de obscuridade. Durante a aclimação, os peixes foram alimentados uma vez por dia com flocos (*Tetra Amin*). A limpeza dos aquários era efectuada diariamente, retirando os peixes mortos de imediato.

## 2.2. Simulação de um efluente doméstico

Através de uma mistura química simulou-se uma água residual doméstica como é indicado no Quadro 2.1.

Quadro 2.1 – Composição do efluente sintético – solução mãe.

Reagentes	Concentração (g. L <sup>-1</sup> )
Glucose	25
Peptona	5
Extractos de levedura	2,5
KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1
CaCL <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1
FeCL <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005
MnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,05

Para a preparação da solução mãe, utilizou-se água desmineralizada e para as diluições usadas nos testes, usou-se água da torneira, com remoção prévia de cloro.

Para a verificação da CQO usava-se 10 ml da solução mãe diluída a 1:100, seguindo a Norma Internacional ISO nº 6060 de 1989, para a determinação respectiva.

No Quadro 2.2 indicam-se os parâmetros físico-químicos determinados no efluente ao longo dos ensaios e os respectivos métodos analíticos.

Quadro 2.2 – Parâmetros físico-químicos determinados no efluente sintético.

Parâmetro	Expressão dos resultados	Aparelho/Método	Métodos analíticos
pH	Escala de Sorensen	Calibração do electrodo de pH ligado ao Orion 920A	Potenciométrico
Temperatura	°C	Oxi 340i/set (wtw, weilhein, Germany)	Potenciométrico
Oxigénio dissolvido (O <sub>2</sub> )	mg.L <sup>-1</sup>	Oxi 340i/set (wtw, weilhein, Germany)	Potenciométrico
Condutividade	µS/cm	ORION conductivity, salinity meter, model 140	Potenciométrico
Carência Química de Oxigénio (CQO)	mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup>	Método do dicromato de potássio (APHA, 1992)	Método do Refluxo

## 2.3. Ensaios Biológicos

### 2.3.1. Teste de toxicidade aguda em *Danio rerio*

No presente trabalho, para a realização dos testes de toxicidade aguda, foram seguidas as orientações descritas na norma “Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine” (USEPA, 1996).

O efluente sintético foi armazenado a – 4 °C, para minimizar alterações da respectiva composição, devidas a actividade biológica. Foram utilizadas seis concentrações (250, 275, 290, 300, 325, 350 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) de efluente e um controlo, constituído por água sem adição de efluente. No sentido de confirmação dos resultados, os testes foram realizados em triplicado (teste 1, teste 2 e teste 3) em conjunto com o teste de controlo. Em cada ensaio, foram utilizados 8 peixes em 10 litros de efluente a diferentes concentrações. Os resultados da análise de CQO da solução mãe concentrada, diluída 1:100, confirmaram o valor nominal estimado (350 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>).

As concentrações utilizadas de efluente no teste de toxicidade aguda, CL<sub>50</sub>, do peixe zebra foram: 250, 275, 290, 300, 325 e 350 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados em condições semi-estáticas, com a duração de 96h e renovação do meio a cada 24 horas, à temperatura de 18 a 20 °C, com arejamento contínuo, fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de

obscuridade, não se fornecendo alimento durante os ensaios. Para cada ensaio foram determinados os valores de pH, temperatura, condutividade e CQO no início e no fim de cada teste e de cada renovação do meio.

O critério indicativo de toxicidade foi a mortalidade de peixes observada. Os testes eram considerados válidos sempre que no controlo a mortalidade não ultrapassava o limite de 10%, como recomendado pela USEPA (1996). A Figura 2.2 mostra o sistema de tanques utilizado nos ensaios de toxicidade aguda.



Fig. 2.2 – Sistema de tanques para os ensaios de toxicidade aguda

#### 2.3.2. Ensaio para o estudo do comportamento do *Danio rerio*

Para a realização dos ensaios de simulação de frentes de descarga e de descargas instantâneas, dispôs-se em condições laboratoriais controladas, de um canal (297 cm x 10 cm), representado na Figura 2.3, dividido em três compartimentos (A, B, C), separados por grelhas de malha metálica (3 mm), de modo a permitir a separação dos organismos e a passagem da água. Para a simulação de um curso de água, manteve-se o canal com um fluxo constante de água da torneira filtrada (filtros de carvão activado), com entrada pelo compartimento A e saída pelo compartimento C.

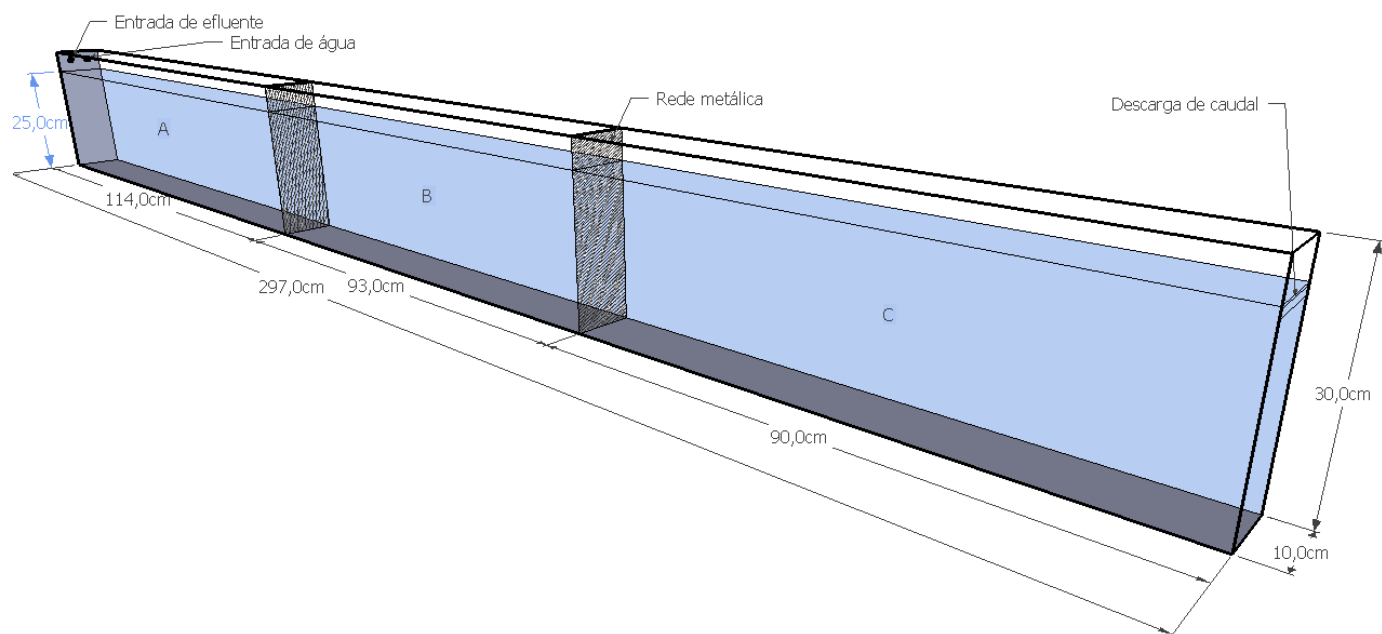


Fig. 2.3 – Esquema do canal

Realizaram-se três ensaios de simulação de frentes de descarga, injectando o efluente sintético no compartimento A de acordo com as condições indicadas no Quadro 2.3. Em cada ensaio, utilizaram-se 10 peixes por compartimento. Para uma melhor visualização da dispersão do efluente ao longo do canal, efectuou-se um teste sem peixes, adicionando 5 ml de rodamina a um caudal de 0,385 L/min de efluente sintético ( $34\,200\text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ), registando-se o tempo necessário para o efluente atingir os pontos médios e extremos de cada compartimento.

Quadro 2.3 – Ensaio para simulação de frentes de descarga

Condições da frente de descarga				
Teste	Caudal de injeção de efluente sintético, L/min	CQO do efluente sintético, $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$	Volume de efluente sintético injectado, L	Caudal de injeção de água no canal, L/min
1	0,033	2800	1	1
2	0,239	5600	2	0,25
3	0,385	11200	18	0,25

Efectuou-se um ensaio de descarga instantânea, utilizando apenas uma parte do compartimento A, com 0,6m de comprimento, no qual se colocaram 30 peixes. A simulação de descarga materializou-se despejando no referido compartimento um volume de 5L de efluente sintético a uma concentração de 11200 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. No canal manteve-se um fluxo de água de 0,25 L/min.

Imediatamente após a descarga do efluente, foram retiradas as grelhas que limitavam os compartimentos, por forma a permitir a livre mobilidade dos peixes. Também neste tipo de ensaio se efectuou uma simulação com rodamina, adoptando o mesmo procedimento e usando 15 mL de corante no volume despejado instantaneamente.

Durante este ensaio, foram controlados o oxigénio dissolvido, a temperatura, o pH e a CQO. Para a análise da CQO foram recolhidas amostras nos extremos de cada compartimento e para os restantes parâmetros as medições foram efectuadas no centro do mesmo.

Nos Quadros 2.4 e 2.5 indicam-se os tempos utilizados para o corante atingir progressivamente diferentes secções do canal respectivamente nos ensaios de frentes de descarga e de descargas instantânea.

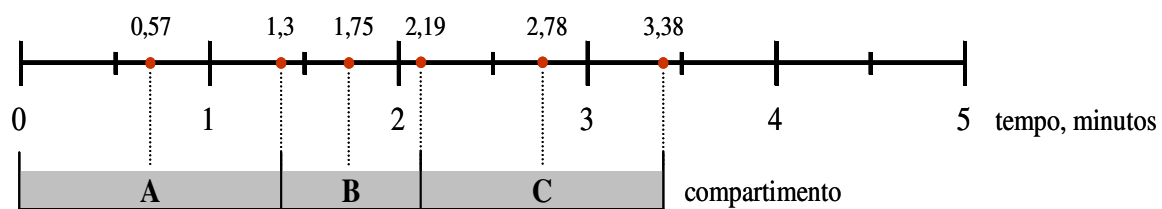
Quadro 2.4 – Ensaio de Rodamina (frentes de descarga)

Compartimento	Posição/Secção	Tempo (minutos)
A	Média	0,57
	Final	1,3
B	Média	1,75
	Final	2,19
C	Média	2,78
	Final	3,38

Quadro 2.5 – Ensaio de Rodamina (descargas instantâneas)

Compartimento	Posição/Secção	Tempo (minutos)
A	Média	0,33
	Final	0,67
B	Média	0,97
	Final	1,27
C	Média	1,6
	Final	2

### frente de descarga



### descarga instantânea

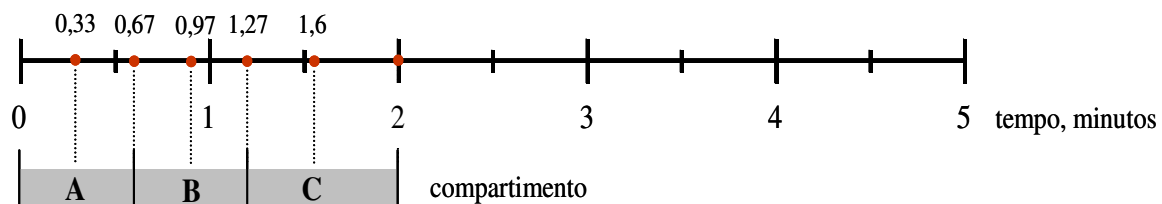


Fig.2.4 – Visualização do tempo necessário para o corante chegar ao final do canal em frente de descarga e em descarga instantânea

Na Figura 2.4 mostra-se o avanço do corante em frente de descarga e em descarga instantânea, verificando-se que a sua progressão é muito mais rápida na segunda simulação, ou seja, atinge todo o canal em 2 minutos, quando em frente de descarga é necessário um tempo de 3,38 minutos.



### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Testes de toxicidade aguda com *D. rerio*

##### 3.1.1. Caracterização físico-química do efluente

No Quadro 3.1 indicam-se os valores dos parâmetros físico-químicos da solução mãe de efluente sintético utilizado nos ensaios de toxicidade aguda.

Quadro 3.1 – Caracterização físico-química do efluente sintético.

Parâmetros	Mínimo	Máximo	Média ± Desvio padrão
pH	5,517	5,756	5,637±0,17
Temperatura (°C)	19,9	20,1	20,0±0,14
Condutividade (mS/cm)	13,18	13,56	13,370±0,27
CQO (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	33 330	37 600	35 465±3019,3

Foi preparado um gradiente de concentrações, a partir de diferentes diluições da solução mãe, com concentrações de 250, 275, 290, 300, 325 e 350 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

No Quadro 3.2 encontram-se registados os valores obtidos para os parâmetros físico-químicos do efluente utilizado nos ensaios de toxicidade aguda (resultados mais detalhados encontram-se representados no Anexo I, Quadros 1 a 9).

Quadro 3.2 – Caracterização físico-química do efluente utilizado nos ensaios laboratoriais de toxicidade aguda

Parâmetro	n	Mínimo	Máximo	Média ± Desvio Padrão
pH	8	5,57	8,16	7,12±0.083
Temperatura (°C)	8	18	20	19±1
Condutividade (µS/cm)	8	510	667	558,17±52,6
CQO (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	8	116,5	349,09	236,67± 78

(n = número de determinações)

### 3.1.2. Sobrevivência dos animais expostos

Uma vez que neste estudo o critério indicativo de toxicidade nos testes agudos foi a mortalidade dos peixes, no Quadro 3.3 mostram-se os valores de  $CL_{50}$  para os 3 testes de toxicidade aguda realizados com o *D. rerio* e a respectiva média.

Quadro 3.3 – Resultados de  $CL_{50}$  para *D. rerio* (IC = Intervalo de confiança).

Ensaio	CQO ( $\text{mg O}_2\text{L}^{-1}$ )	
	$CL_{50} - 96\text{h}$	I. C. 95%
Teste 1	310,192	301-322
Teste 2	309,135	299-322
Teste 3	308,126	299-320
Média	309,197	304-315

Nota: Os valores de  $CL_{50}$  foram calculados usando o método de Probit proposto pela USEPA (2002).

Constata-se que os resultados não apresentam uma dispersão acentuada, perante a determinação da  $CL_{50}$ .

Na Figura 3.1 apresentam-se as estimativas dos valores de concentração letal (CL) para os peixes-zebra, expostos a diferentes concentrações de efluente, num período de 96 horas.

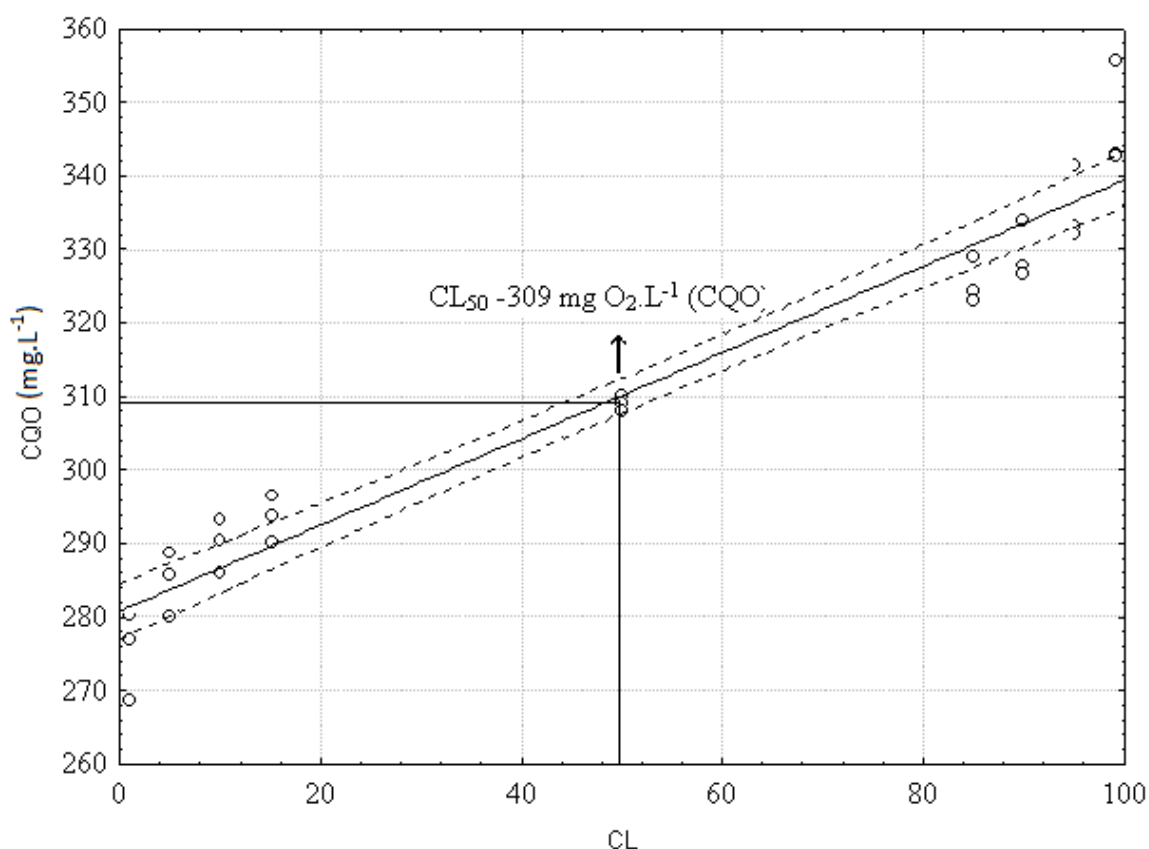


Fig. 3.1 – Variação da concentração letal e respectivos limites de confiança.

As concentrações 325 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e 350 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> de efluente provocaram uma diminuição significativa na sobrevivência dos peixe-zebra em relação ao controle, sendo que os valores de sobrevivência obtidos foram de 16,63% e 0 %, respectivamente. No Anexo 2 (Quadros 10, 11 e 12), encontram-se esquematizados os dados relativos a mortalidade do peixe-zebra, nos 3 testes, durante as 96 horas.

Assim, estima-se que o valor da CL<sub>50</sub> (96h) seja de 309 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> (CQO). Os resultados obtidos são da mesma ordem de grandeza dos valores indicados por Santos (2005), que observou valores similares de CL<sub>50</sub>, expondo a mesma espécie a efluente bruto de uma estação de tratamento de águas residuais urbanas, durante 96 horas.

### **3.2. Resultados dos testes de mobilidade dos peixes face a uma frente de descarga e uma descarga instantânea.**

No Quadro 3.4 indicam-se os valores de CQO registados ao longo do canal para os testes realizados.

Quadro 3.4 – Valores de CQO determinados nos compartimentos do canal.

Compartimento	Tempo (minutos)						
	15	15	30	15	45	0	10
	Frente de descarga					Descarga instantânea	
	Teste 1	Teste 2		Teste 3			
A (Início)	70,6	475,3	310,6	1326,04	1808,7	1649	292
A (Fim)	<30	235,3	230,6	1233,6	1749,64		
B (Início)	<30	183,5	-	1215,25	1841,73	567	188
B (Fim)	<30	117,7	-	837,99	1749,64		
C (Início)	<30	94,1	-	897,84	1715,9	23	205
C (Fim)	<30	75,3	-	824,2	1703,6		

Nas Figuras 3.2 a 3.5 mostra-se a evolução da concentração de CQO ao longo do canal.

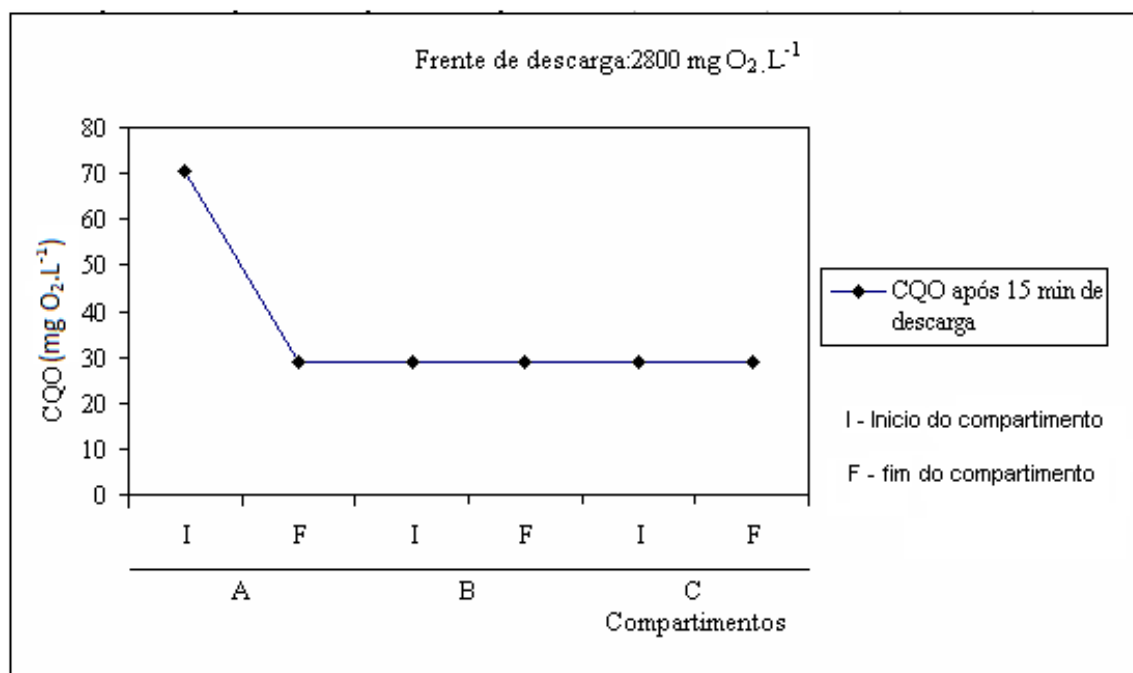


Fig.3.2 – Evolução da concentração de CQO ao longo do canal, após descarga de um efluente com  $2800 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  (Teste 1)

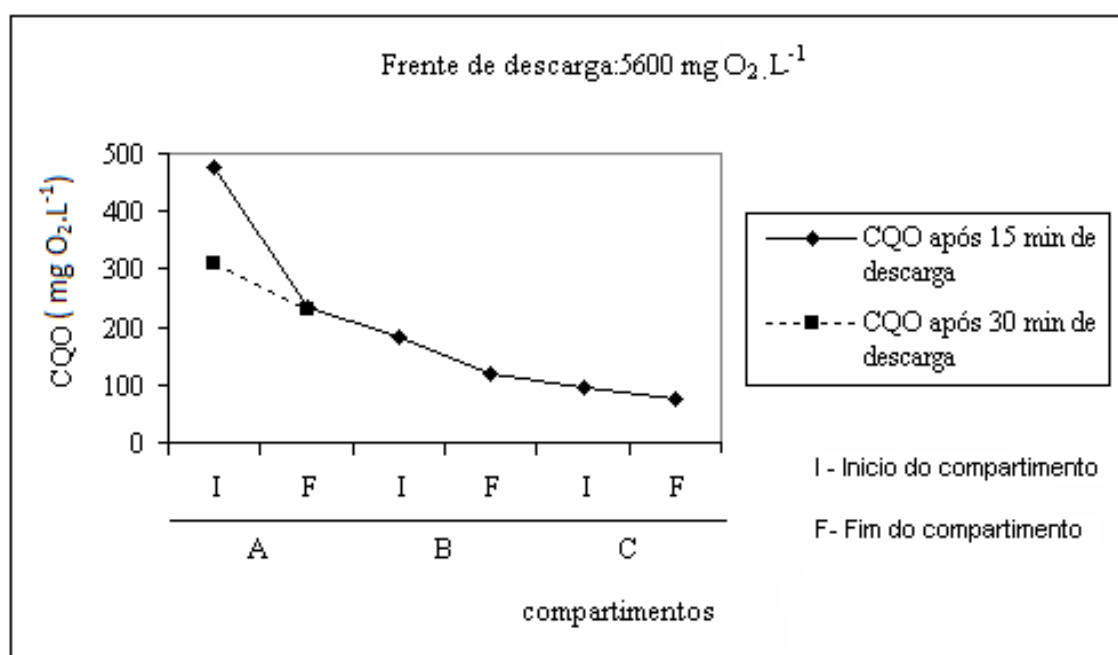


Fig. 3.3 – Evolução da concentração de CQO ao longo do canal, após descarga de um efluente com  $5600 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  (Teste 2)

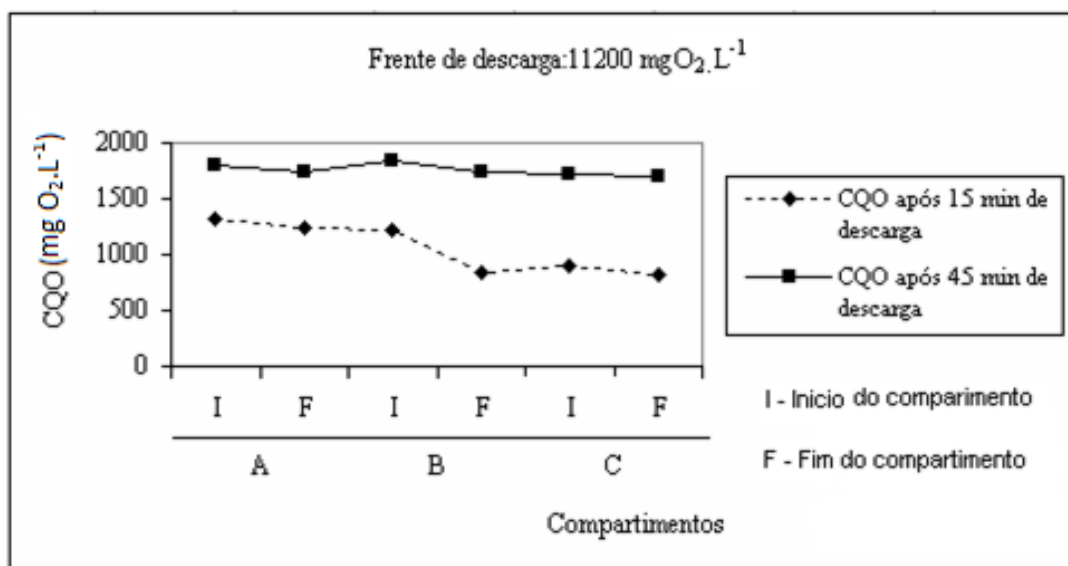


Fig. 3.4 – Evolução da concentração de CQO ao longo do canal, após descarga de um efluente com 11200 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> (Teste 3)

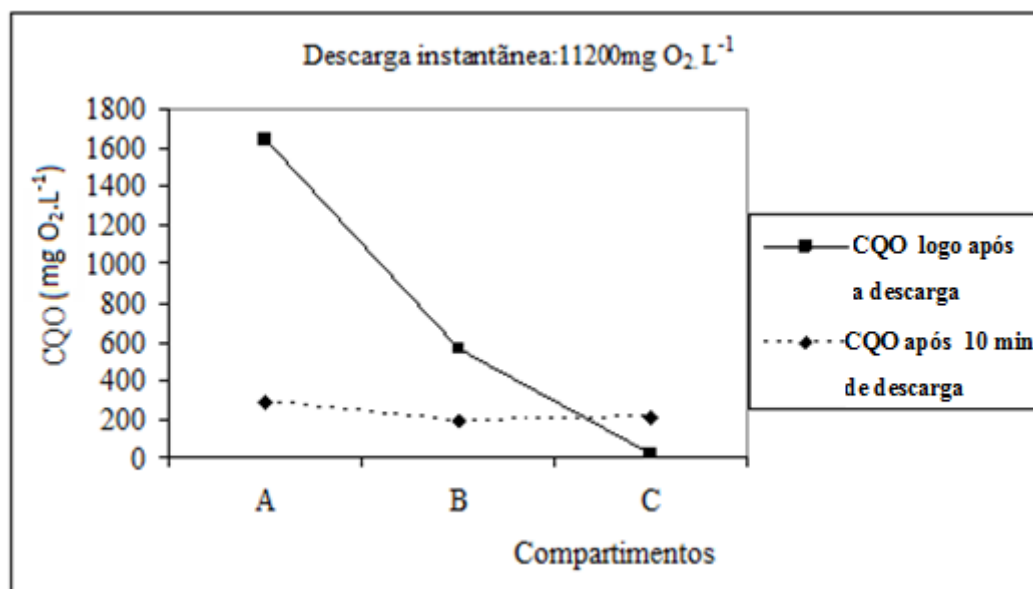


Fig. 3.5 – Evolução da concentração de CQO ao longo do canal, após uma descarga instantânea de um efluente com 11200 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>

Os resultados obtidos mostram uma diluição progressiva de CQO ao longo dos compartimentos do canal, obtendo-se valores mais elevados junto do ponto de descarga do efluente. Contudo, no fim dos ensaios, observou-se uma tendência para uma distribuição homogênea dos valores de CQO ao longo de todo o canal.

Durante os ensaios, foram monitorizados alguns parâmetros físico-químicos como a temperatura, pH e oxigénio dissolvido, conforme se indica no Quadro 3.5. Os resultados

analíticos detalhados, obtidos durante os testes, encontram-se no Anexo 3 (Quadros 16, 17 e 18).

Quadro 3.5 – Caracterização físico-química geral do meio líquido no canal durante os ensaios.

Parâmetros	Compartimentos		
	A	B	C
	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão
<b>T (°C)</b>	15,83±0,91	15,94±0,85	15,89±0,77
<b>O. D. (mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>)</b>	3,00±0,19	3,14±0,41	3,46±0,49
<b>pH</b>	9,79±0,14	6,89±0,19	6,89±0,17

Relativamente ao comportamento de *Danio rerio*, no Quadro 3.6 mostra-se a mobilidade observada em termos quantitativos, ou seja, da respectiva reacção, não se tendo quantificado por números de indivíduos, o que seria muito difícil para as condições experimentais disponíveis.

Quadro 3.6 – Comportamento dos peixes face a diferentes gradientes de concentração de matéria orgânica.

Ensaio	CQO injectado (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	Observação do Comportamento
Frente de descarga	2800	Não se registou alteração aparente do comportamento em qualquer dos compartimentos. Os peixes mantiveram um padrão de mobilidade semelhante a um ensaio controlo.
Frente de descarga	5600	Registou-se uma alteração do padrão de mobilidade, com deslocação para o sentido oposto à descarga, após 15 minutos de exposição, no primeiro compartimento, diminuindo nos restantes.
Frente de descarga	11200	Comportamento semelhante ao do ensaio anterior, mas após 5 minutos de exposição, em todos os compartimentos.
Descarga instantânea	11200	Mobilidade de todos os indivíduos no sentido de jusante, imediatamente após contacto com a descarga instantânea.

No Quadro 3.7, indicam-se aproximadamente, os valores de mobilidade, expressos em percentagem do número de indivíduos de cada compartimento que se deslocou para o respectivo extremo jusante.

Quadro 3.7 – Percentagem (%) de indivíduos que se deslocaram para o extremo jusante de cada compartimento

CQO (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> ) da frente de descarga	Tempo após injeções da frente de descarga (min)	Compartimentos		
		A	B	C
2800	15	0	0	0
5600	15	60	40	20
	30	80	60	40
11200	5	100	40	20
	15	100	80	60
	45	100	100	80

Verifica-se assim uma resposta dos peixes ao ambiente criado pela frente de descarga, sendo evidente uma mobilidade no sentido oposto aos efeitos da poluição.

No Quadro 3.8, indica-se o que foi observado para uma descarga instantânea de poluição.

Quadro 3.8 – Percentagem (%) de indivíduos que se deslocam para o extremo jusante de cada compartimento (descargas instantâneas).

CQO (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> ) de descarga instantânea	Tempo após injeções da frente de descarga (min)	Compartimentos		
		A	B	C
11 200	0	100	80	40
	10	100	100	80

Nas Figuras 3.6 a 3.9, evidencia-se a mobilidade dos peixes, devendo salientar-se que, para além do padrão de fuga ao contacto com a descarga, se observou uma nítida desorientação dos indivíduos, com deslocação erráticas.

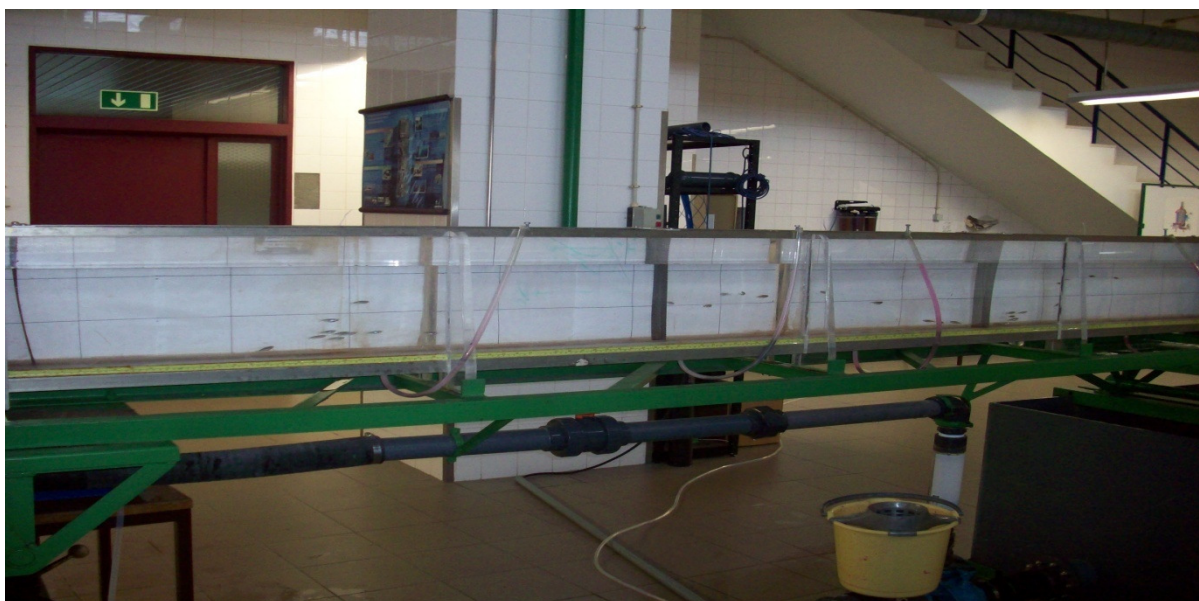


Fig. 3.6 – Comportamento dos peixes face a uma descarga de efluente de 2800 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e a um fluxo de 0,033 Lmin<sup>-1</sup>



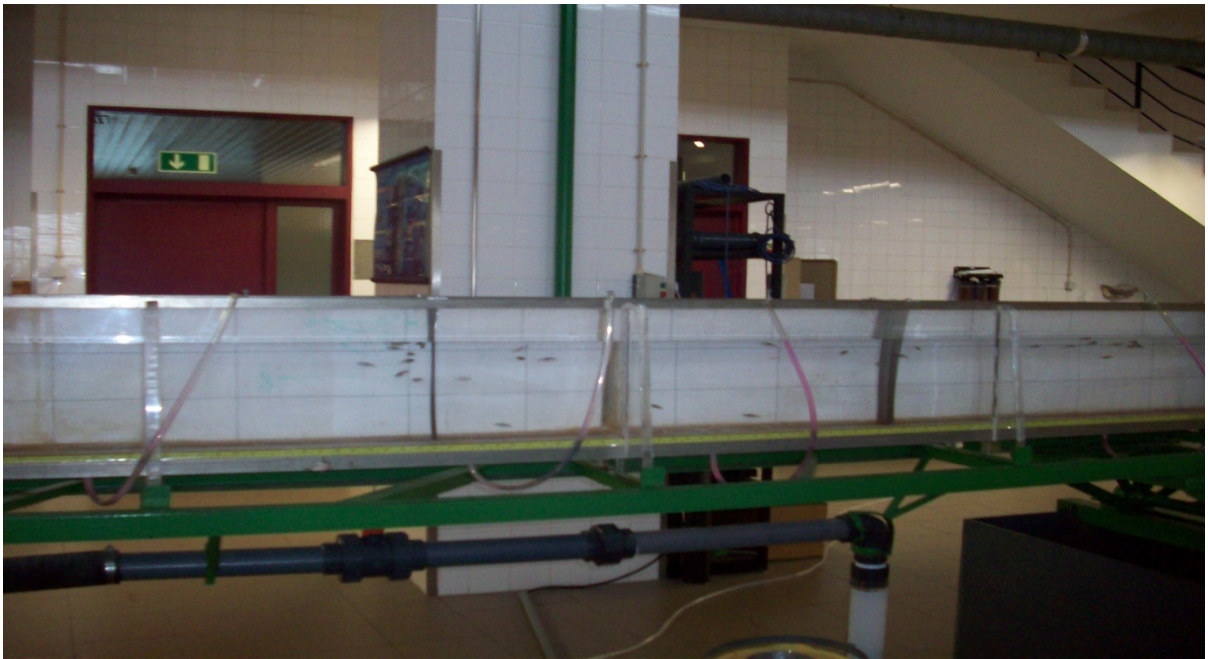


Fig. 3.7 – Comportamento dos peixes face a uma descarga de efluente de  $5600 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  e um fluxo de  $0,239 \text{ Lmin}^{-1}$

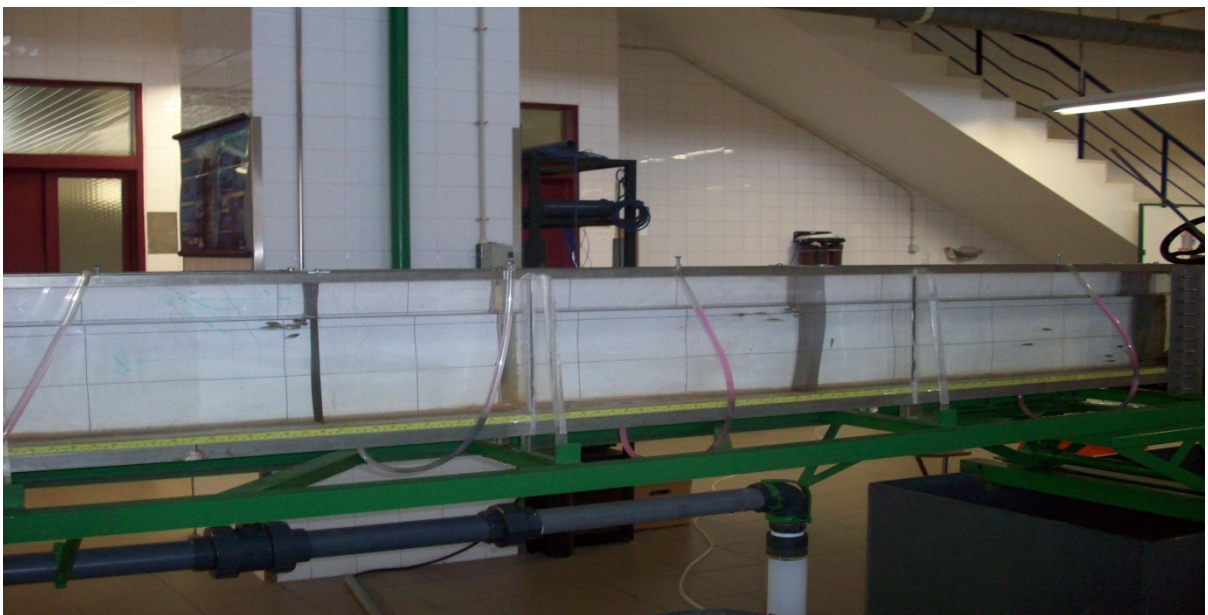


Fig.3.8 – Comportamento dos peixes face a uma descarga de efluente de  $11200 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  e um fluxo de  $0,385 \text{ Lmin}^{-1}$





Fig. 3.9 – Visualização da fuga generalizada dos peixes, originada pela descarga instantânea

Nas Figuras 3.10 a 3.14, relacionam-se os padrões (aproximados) de mobilidade com a progressiva concentração da CQO no canal, para as diferentes frentes de descargas simuladas.

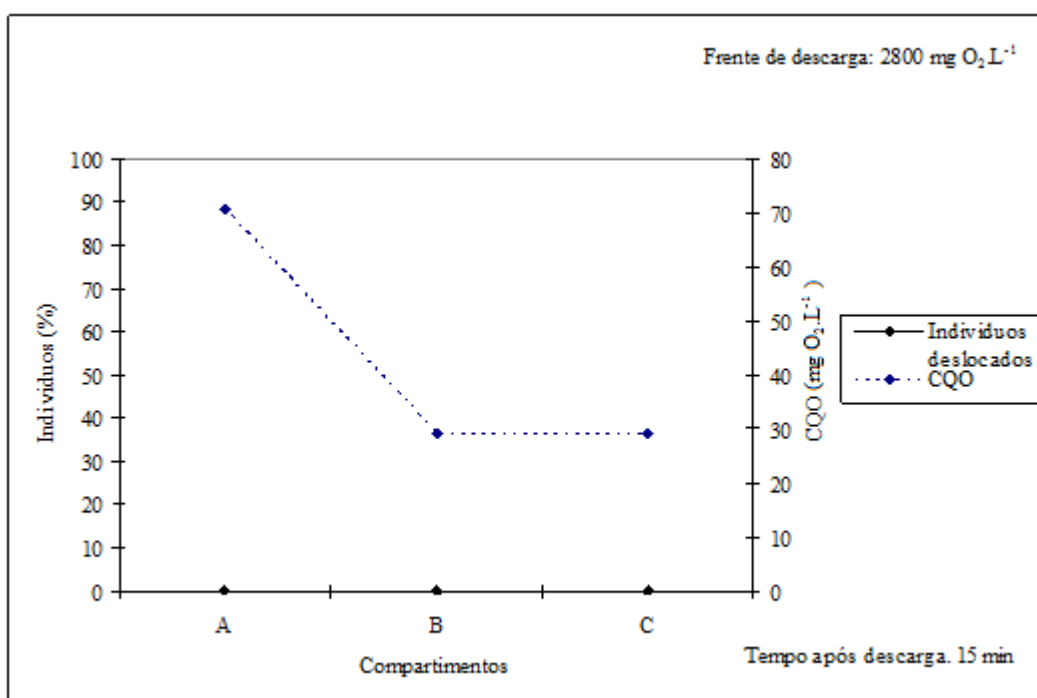


Fig. 3.10 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a frente de descarga de 2800 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>

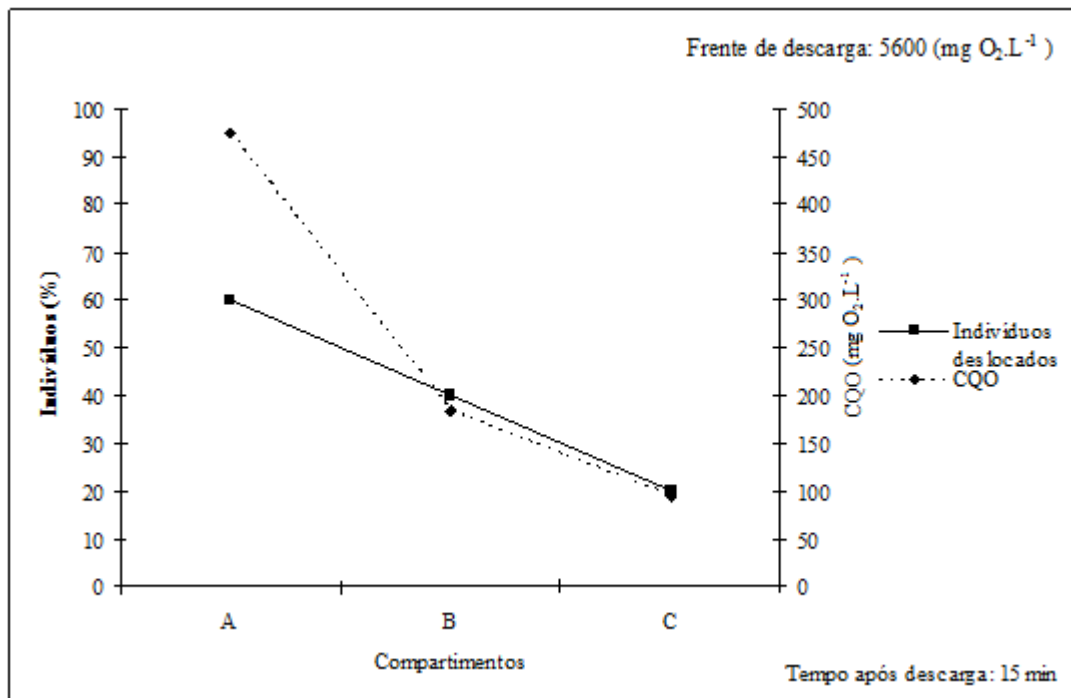


Fig. 3.11 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a frente de descarga de 5600 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>

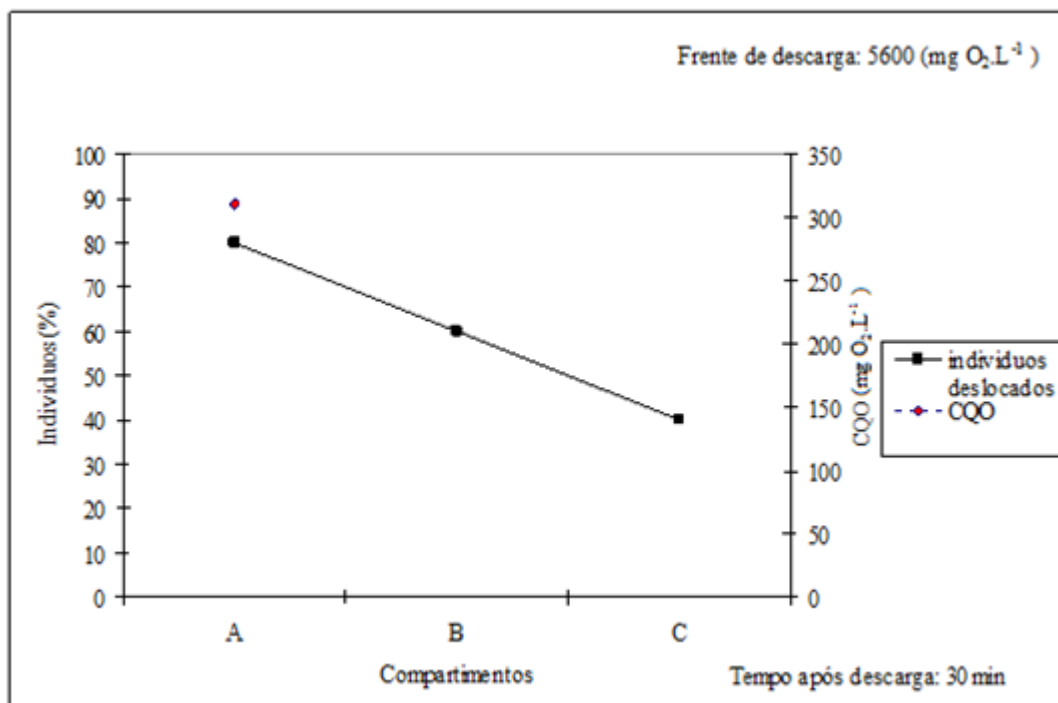


Fig. 3.12 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a frente de descarga de 5600 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>

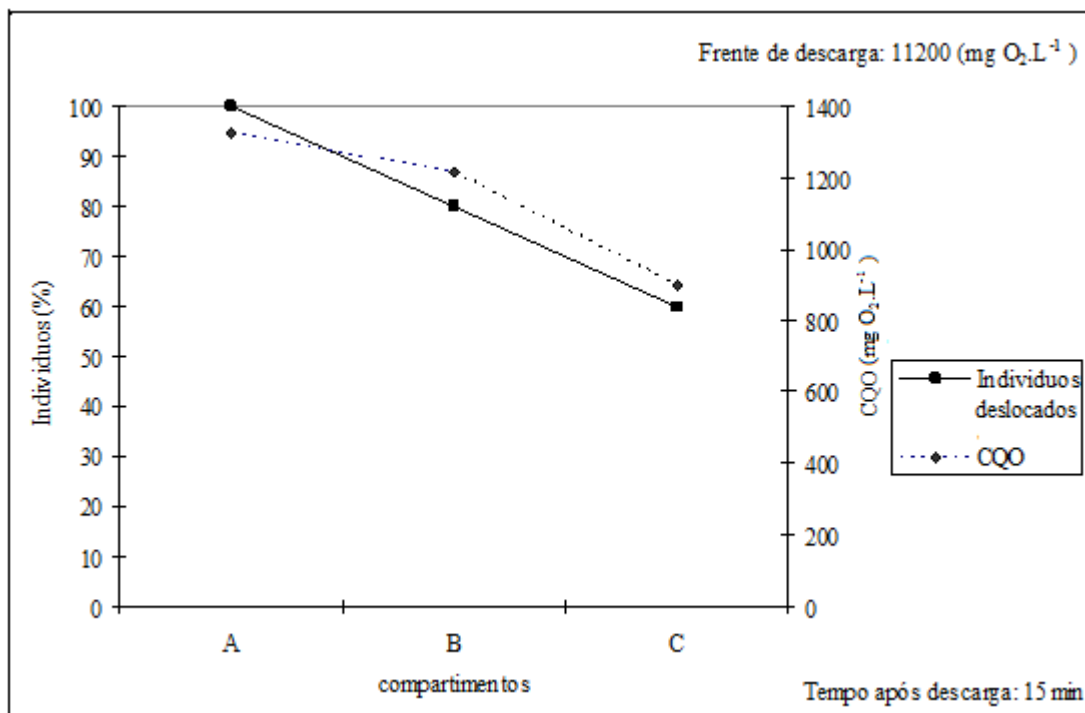


Fig. 3.13 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a frente de descarga de 11200 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>

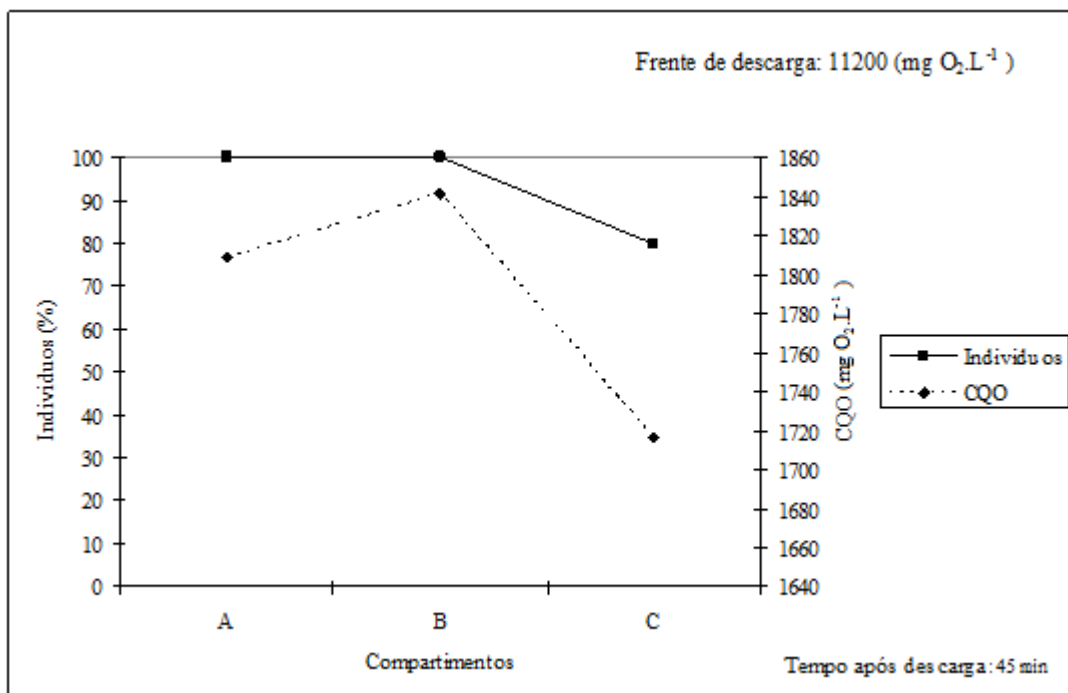


Fig. 3.14 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a frente de descarga de 11200 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>

Nas Figuras 3.15 e 3.16 grafica-se a situação observada para a descarga instantânea.

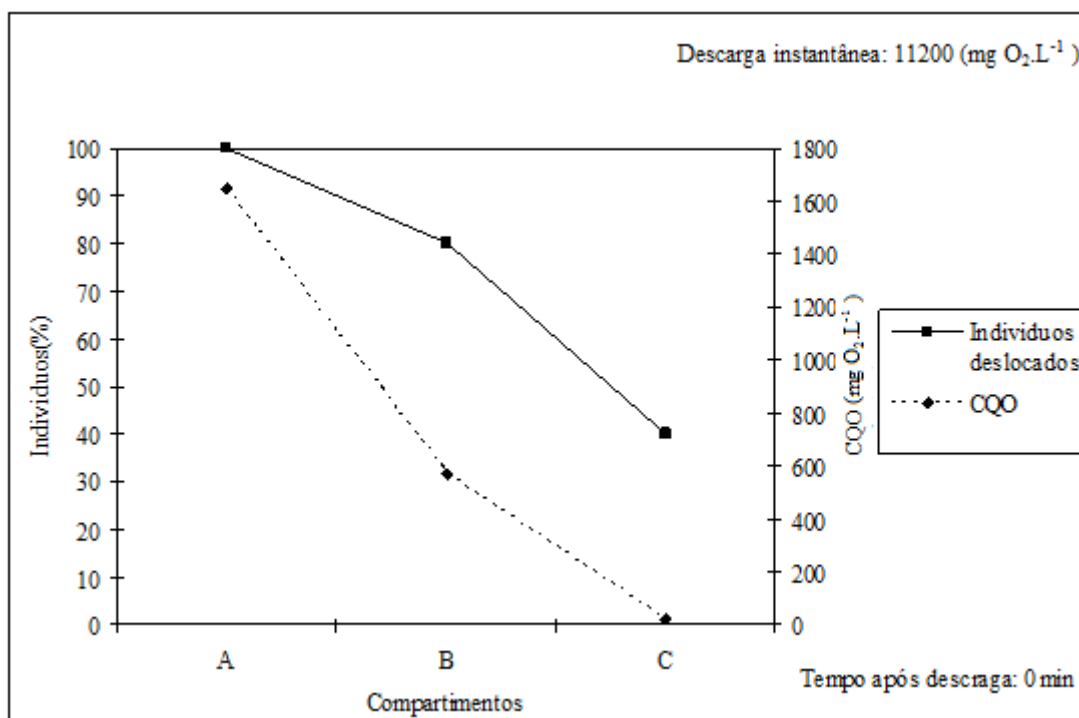


Fig. 3.15 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a descarga instantânea de 11200 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>

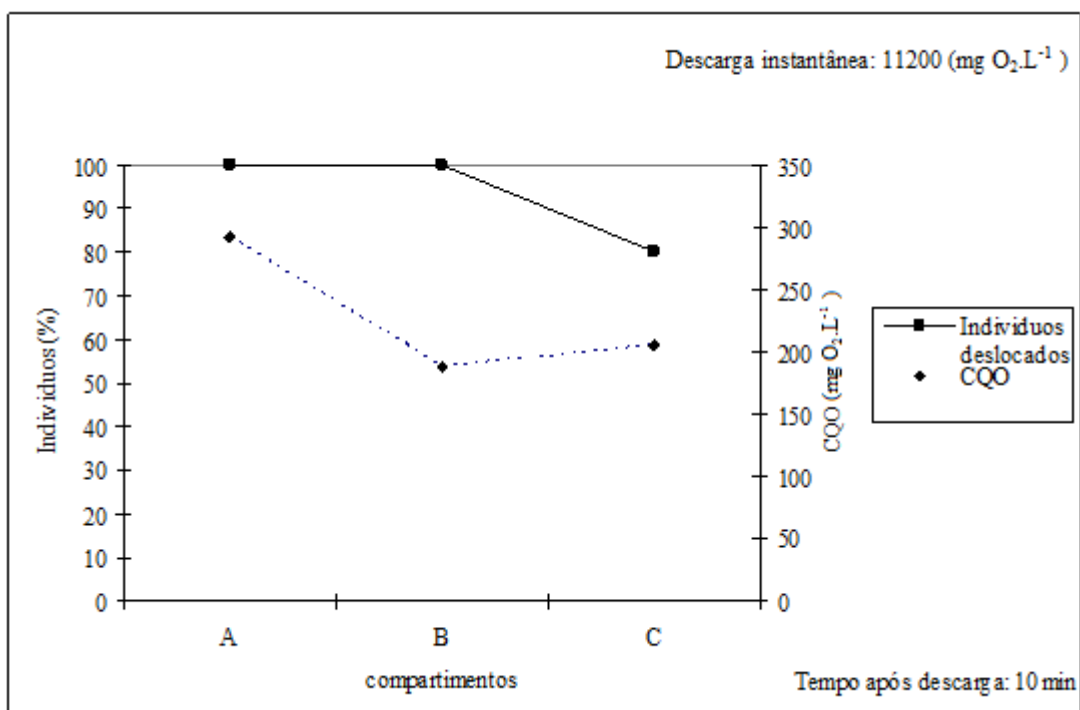


Fig. 3.16 – Relação entre os padrões de mobilidade e a progressiva concentração da CQO no canal, para a descarga instantânea de 11200 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>

Verifica-se, através dos gráficos apresentados, que a concentração de 2800 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> não exerce influência no comportamento dos peixes, não sendo notório um deslocamento no sentido contrário ao ponto de descarga. No entanto verifica-se que, para concentrações iguais ou superiores a 5600 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, ocorre uma resposta comportamental, sendo visível a deslocação dos indivíduos no sentido oposto à descarga. Nota-se portanto que, quanto maior é a concentração de descarga, maior é a percentagem da deslocação dos indivíduos. Conclui-se também que perante uma descarga instantânea a resposta comportamental é muito mais acentuada.

Nos Quadros 3.3 e 3.6, resume-se a informação obtida, relacionando-se concentrações nos compartimentos com o comportamento observado dos peixes.

Para facilidade de interpretação, nos Quadros 3.9 e 3.10 reproduzem-se os mesmos dados, mas considerando as concentrações médias nos compartimentos.

Quadro 3.9 – Variação do comportamento dos peixes em função da concentração no meio (frente de descarga)

Teste, tempo, compartimento	CQO média (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	% de indivíduos deslocados
1, 15, A	40,01	0
2, 15, C	84,7	20
2, 15, B	150,6	40
2, 30, A	270,6	80
2, 15, A	355,4	60
3, 15, C	860,5	60
3, 15, B	1026	80
3, 15, A	1279,5	100
3, 45, C	1709	80
3, 45, B	1795	100
3, 45, A	1778,5	100

Quadro 3.10 – Variação do comportamento dos peixes em função da concentração no meio (descarga instantânea).

Tempo, compartimento	Instantânea	
	CQO média (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	% de indivíduos deslocados
0, C	23	40
10, B	188	100
10, C	205	80
10, A	292	100
0, B	567	80
0, A	1649	100

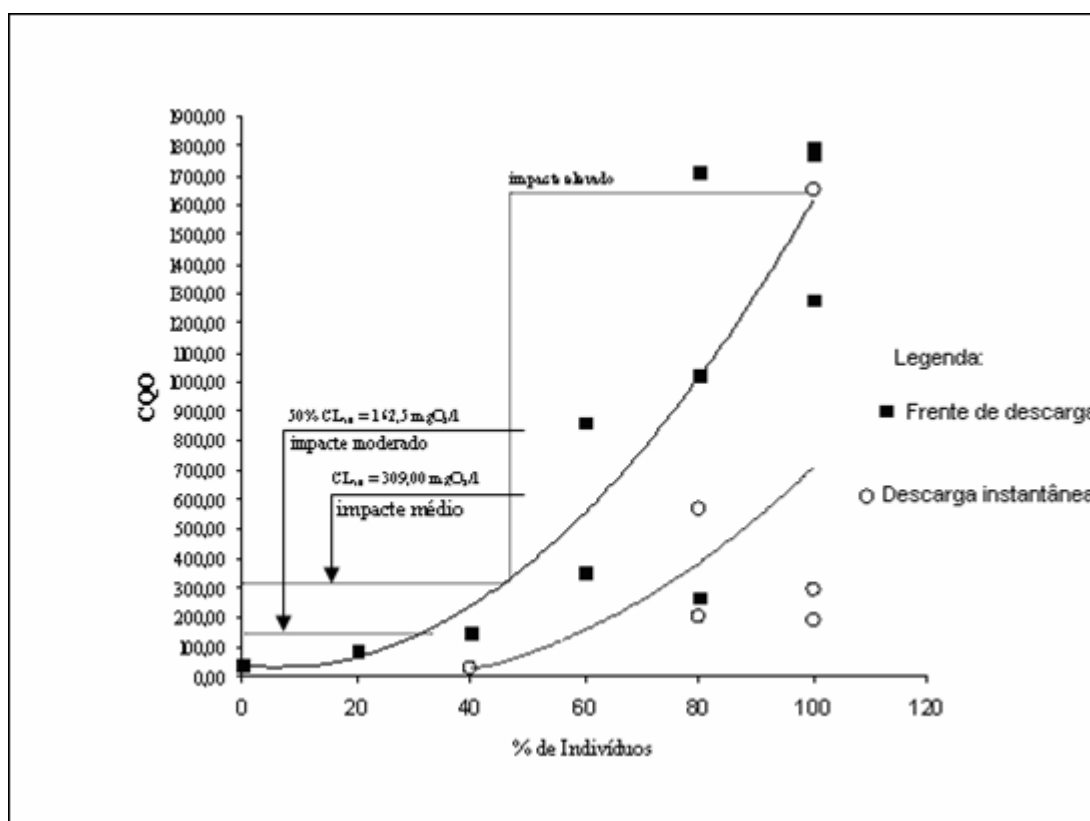


Fig. 3.17- Comparação entre o comportamento dos peixes e a concentração de CQO nas frentes de descarga e descarga instantânea

Na Figura 3.17, mostra-se a variação dos valores constantes do Quadros 3.8 e 3.9, verificando-se parecer existir uma relação entre as concentrações e as respostas dos peixes. Apesar das dificuldades de observação do comportamento dos peixes, aparenta ser possível admitir-se quatro faixas de concentração no meio correspondentes a impactes mais ou menos acentuados, ou seja: até 20% da CL<sub>50</sub>, praticamente não deverá haver impactes significativos; entre 20% e 50% da CL<sub>50</sub>, os impactes deverão ser moderados, admitindo-se que possam ser

reversíveis; entre 50% e 100% da  $CL_{50}$ , os impactes serão mais importantes não sendo evidente concluir se serão totalmente reversíveis. Para valores superiores à  $CL_{50}$ , face às respostas observadas, é de admitir que os impactes sejam severos.

Comparando as curvas obtidas para os dois tipos de descarga, observa-se, como seria de esperar, que as respostas e, conseqüentemente, os impactes, são mais rápidos para as descargas instantâneas.

#### **4. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro**

Com o presente trabalho foi possível concluir que a resposta dos peixes a um estímulo de poluição varia com a severidade da descarga, parecendo poder-se relacionar com a  $CL_{50}$ .

Os resultados mostram que as descargas instantâneas, embora dependendo da concentração que atinjam no meio, provocam respostas mais rápidas em termos comportamentais.

Para que os resultados pudessem ser utilizados para estimar impactes de descargas no biota aquático seria necessário efectuar um maior número de simulações, de forma a poder-se identificar uma relação causa efeito mais consistente. No entanto, os resultados são indicativos de que as frentes de descarga, ao provocarem respostas menos evidentes, poderão, se forem continuadas, mascarar efeitos crónicos.

Como trabalho futuro, seria interessante modelar os dois tipos de descarga, para o que seria necessário determinar com maior precisão a resposta dos peixes, o que poderia ser efectuado com recurso a fotografias do canal para localização dos peixes ao longo do canal em função do tempo.



## 5. Referências bibliográficas:

Abel, P.D. (1989). Water pollution Biology, Ellis Horwood Limited, England, pp. 39-44.

Amazu, A.T. (1997). The impact of urbanization and development on surface waters in Ghana-case studies. Water Resources Research Institute, Council for Scientific and Research, Freshwater contamination, IAHS publication n°.243, Edited by Bruce Webb, pp. 117-120.

Andrade, R.M. (2004). Efeitos de exposição do peixe *Danio rerio* a um efluente têxtil, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pp. 1-2.

APHA, (1992). American Public Health Association, Washington, DC, 18ed.

Azevedo, R. T. (2003). Descargas de águas residuais na Ria Formosa – Cabanas de Tavira, <http://www.naturlink.pt/canais/Artigo.asp?iArtigo=13270>; consultado em Junho de 2007.

Barbier, E. (2003). Efeito do Las-C12 (Dodecil Benzeno Sulfato de Sódio) sobre alguns parâmetros do comportamento da Tainha (MUGIL PLATANUS), Instituto de Pesca da Secretária de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Rio Grande, **27** (1), pp. 49-57.

Bernet, D., Schmidt-Posthaus<sup>1</sup>, H., Wahli<sup>1</sup> T. Burkhardt-Holm, P. (2000). Effects of wastewater on fish health: an integrated approach to biomarker responses in brown trout (*Salmo trutta* L.), Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, **8**, pp. 143–151.

Bernet, D., Schmidt, H., Wahli, T. Burkhardt-Holm, P. (2001). Effluent from a sewage treatment works cause changes in serum chemistry values of brown trout (*Salmo trutta* L.), Ecotoxicology and Environmental Safety, **48**, pp. 140-147.

Blum, D.J. e Speece, R.E. (1990). Determining chemical toxicity to aquatic species, The use of QSARs and surrogate organisms, **24**, pp. 284 – 293.

Breine, J.J., Maes, J., Quataert, P., Van den Bergh, E., Simoens, I., Van Thuyne, G. Belpaire, C. (2007). A fish-based assessment tool for the ecological quality of the brackish Schelde estuary in Flanders (Belgium), *Hydrobiologia*, **575**, pp. 141–159.

Breitburg, D. (2002). Effects of Hypoxia, and the Balance between Hypoxia and Enrichment, on Coastal Fishes and Fisheries, The Academy of Natural Sciences, Estuarine Research Center, **25**, pp. 767–781.

Boavida, M.J. (2001). Problemas de qualidade da água: eutrofização e poluição, <http://www.ordembilogos.pt/Publicacoes/Biologias/Qagua%20--%2001Jan01.pdf>; consultado em Março de 2007.

Cengiz, E.I. Unlu, E. (2003). Histopathology of Gills in Mosquitofish, *Gambusia affinis* After Long-Term Exposure to Sublethal Concentrations of Malathion. *Jornal of Environmental Science and Healt part B- Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, **B38**, pp. 581–589.

Diniz, M. S., Peres, I. Pihan, J. C. (2004). Comparative study of the estrogenic responses of mirror carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated municipal sewage effluent (Lisbon) during two periods in different seasons. *Science of the Total Environment*, **349**, pp. 129 – 137.

Fent, K. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, **140-141**, pp. 353-365.

Gaivao, M.O.M. (1985). Rio Corgo: Efeitos da poluição orgânica sobre a fauna macrobentónica, pp. 9-13.

Harrison, T.D. Whitfield, A.K. (2004). A multi-metric fish index to assess the environmental condition of estuaries, *Journal of Fish Biology*, **65**, pp. 683–710.

Hawthorne R. (2001). Institute of Neuroscience, University of Oregon Eugene, Zebrafish K-12, [http://www.neuro.uoregon.edu/k12/george\\_streisinger.html](http://www.neuro.uoregon.edu/k12/george_streisinger.html), consultado em junho de 2007.

Hynes, H. B. N. (1960). The Biology of Polluted Waters, London, Liverpool University Press, p. 202.

Jordão, C.P., Pereira, M. G., Bellato, C.R., Pereira, J.L. Matos, A.T. (2001). Assessment of water systems for contaminants from domestic and industrial sewages, Environmental Monitoring and Assessment, **79**, pp. 75–100.

Jobling, S., Tyle, C.R. (2003). Endocrine disruption, parasites and pollutants in wild freshwater fish. Parasitology, **126**, pp. S103-S108.

Kithiia S., Ongwenyi, G. S. (1997). Some problems of water quality degradation in the Nairobi River sub-basins in Kenya, in: Department of Geography, College of Education and External Studies, University of Nairobi, Department of Geography, College of Humanities and Social Sciences, University of Nairobi, Freshwater Contamination, Bruce Webb, IAHS publication no. **243**, pp 121-126.

Lacaze, J.C. (2000). A Poluição dos mares, Instituto Piaget, Biblioteca Básica de Ciência e Cultura, Porto editora, pp.488-491.

Leamon, J. H., Schultz E.T., Crivello J.F. (2000). Variation among four health indices in natural populations of the estuarine fish, *Fundulus heteroclitus* (Pisces, Cyprinodontidae), from five geographically proximate estuaries. Environmental Biology of Fishes, **57**, pp. 451–458.

Miller, R., Mabin, M., Thonson C. (2004). Possible Effects of Treated Wastewater Discharge into a Marine, Assessments of Environmental Effects: Christchurch City Council, <http://www.ccc.govt.nz/OceanOutfall/AssessmentOfEnvironmentalEffects/AssessmentOfEnvironmentalEffects.pdf>, consultado em Novembro de 2007.

Moore, M.J., Mitrofanov I.V., Valentin, i S.S., Volkov, V.V., Kurbskiy, A.V., Zhimbey, E.N., Eglinton, L.B. e Stegeman, J.J. (2003). Cytochrome P4501A expression, chemical contaminants and histopathology in roach, goby and sturgeon and chemical contaminants in sediments from the Caspian Sea, Lake Balkhash and the Ily River Delta, Kazakhstan. *Marine Pollution Bulletin*, **46**, pp. 107–119.

Nixon, S.W., Buckley B.A. (2002). A strikingly rich zone – nutrient enrichment and secondary production in coastal marine ecosystems. *Estuaries*, **25**, pp. 782–796.

Norma Internacional ISO nº 6060, (1989). Determinação da Carência Química de oxigénio, Técnicas laboratoriais de Análise de Águas e Águas Residuais.

Odum E.P. (2001). Fundamentos de ecologia, Fundação Calouste Gulbenkian Biblioteca Básica de Ciência e Cultura, Trad. Portuguesa, **5ª ed.**, pp.34-58.

Pacheco, P. (2007). Tratamento de Águas residuais, <http://ambiente.dec.uc.pt/~pacheco/trabalho.pdf>; consultado em Junho, 2007

Pimenta, P. (2007). Descarga no Rio Alviela provocada pela avaria na ETAR de Alcanena, *Jornal O Público*, Lisboa, consultado em 13 de Janeiro de 2007

Rand, G. M. (1995). Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment, Second Edition. Taylor e Francis, London, [http://books.google.com/books?hl=ptPT&lr=&id=1OPdkuiRz08C&oi=fnd&pg=PA12&dq=+Fundamentals+of+aquatic+toxicology,+Rand+1995&ots=ythcl3B7r&sig=x7QGj8\\_pLCZJVeQga1o78eD2h60#PPA53,M1](http://books.google.com/books?hl=ptPT&lr=&id=1OPdkuiRz08C&oi=fnd&pg=PA12&dq=+Fundamentals+of+aquatic+toxicology,+Rand+1995&ots=ythcl3B7r&sig=x7QGj8_pLCZJVeQga1o78eD2h60#PPA53,M1); consultado em Outubro, 2007.

Santos, C. S. (2005). Efeitos Tóxicos da Exposição de D.rerio ao Afluente Bruto de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais Urbanas, Hidrobiologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Scavia, D., Bricker S.B. (2006). Coastal eutrophication assessment in the United States. Biogeochemistry **79**, pp. 7–208.

Schlacher, T. A., Liddell, B., Gaston, T. F., Schlacher-Hoenlinger, M. (2005). Fish track wastewater pollution to estuaries, Oecologia, Springer-Verlag, **144**, pp. 570–584

Schwaiger, J. (2001). Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, **8**, pp. 231–240.

Sponza, D.T. (2002). Necessity of Toxicity Assessment in Turkish Industrial Discharges (Examples from Metal and Textile Industry Effluents). Environmental Monitoring Assessment, **73**, pp. 41-66.

Svobodová, Z., Lloyd, R., Jana, M., Lloyd R., Vykusova B. (1993). Water quality and fish health , <http://www.fao.org/docrep/009/t1623e/T1623E03.htm>, Consultado em Maio 2007

Tebbutt, T. H. Y. (1998). Principles Water Quality Control, 5ed., pp. 21-22

Turner, R.E., Rabalais, N.N., Justic, D, Dortch, Q. (2003). Global patterns of dissolved N, P and Si in large rivers. Biogeochemistry, **64**, pp. 297–317.

USEP, (1996). Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1075 Fish acute toxicity test, Freshwater and Marine, EPA-712-C-96-118, U.S. Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.

USEPA, (2002). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, 4<sup>th</sup> ed., EPA-821-R-02-013, U.S., Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, OH.

Westerfield, M. (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4<sup>th</sup> Edition, University of Oregon Press, Eugene, OR Chapter 1: General methods for zebrafish care.

Whitelaw, K., Solbé, J. F. (1989). River catchment management: An approach to the derivation of quality standards for farm pollution and storm sewage discharges, in: WRc Environment, Medmenham Laboratory, Urban Discharges and Receiving water Quality Impacts, J.B. Ellis, Advances in Water Pollution Control, **21**, pp.145 – 158.

Whitfield, A.K., Elliott, M. (2002). Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. Journal of Fish Biology, **61**, pp. 229–250.

## **6. Anexos**

**Anexo 1. Valores dos parâmetros determinados durante os testes de toxicidade aguda com *Danio rerio*.**

**Anexo 1.1. Valores de pH registados durante os testes de toxicidade aguda com *Danio rerio*.**

Quadro 1 – Valores de pH referentes ao teste 1

CQO / Horas	0	24		48		72		96
	INICIO	FIM	INICIO	FIM	INICIO	FIM	INICIO	FIM
Controlo	7,54	7,38	7,27	7,86	7,43	7,77	7,16	7,77
250	7,55	6,75	6,46	7,44	6,66	7,37	6,71	7,43
275	7,35	6,57	6,41	7,05	6,58	7,20	6,67	7,43
290	7,39	6,55	6,43	7,15	6,40	7,0	6,61	7,37
300	7,42	6,52	6,44	7,18	6,23	7,05	6,58	7,23
325	7,34	6,66	6,37	7,33	6,17	6,94	6,48	7,18
350	7,37	6,52	6,50	6,93				

Quadro 2 – Valores de pH referentes ao teste 2

CQO / Horas	0	24		48		72		96
	INICIO	FIM	INICIO	FIM	INICIO	FIM	INICIO	FIM
Controlo	7,73	8,16	7,53	8,13	7,55	8,05	7,50	8,1
250	6,61	6,60	7,23	7,84	7,13	7,54	7,30	7,90
275	6,69	6,70	7,04	7,16	7,11	7,50	7,26	7,75
290	7,17	6,78	6,97	7,54	7,09	7,39	7,20	7,65
300	7,33	6,86	6,94	7,72	7,05	7,25	7,16	7,55
325	7,24	6,82	6,90	7,50	7,0	7,15	7,15	7,49
350	7,28	6,91						

Quadro 3 – Valores de pH referentes ao teste 3

CQO / Horas	0	24		48		72		96
	INICIO	FIM	INICIO	FIM	INICIO	FIM	INICIO	FIM
Controlo	7,651	8,067	7,498	8,133	7,353	8,050	7,54	8,097
250	7,536	6,780	7,259	6,61	5,790	7,26	6,77	6,90
275	7,543	6,737	7,205	6,55	5,760	7,17	6,70	6,78
290	7,65	6,736	6,96	6,45	5,707	7,20	6,66	6,88
300	7,67	6,705	6,90	6,33	5,66	6,91	6,51	6,69
325	7,77	6,69	6,81	6,30	5,57	6,92	6,51	6,79
350	7,79	6,45						



Anexo 1.2. Valores de condutividade registados durante os testes de toxicidade aguda com *Danio rerio*

Quadro 4 – Valores de condutividade registados no teste 1

CQO/Tempo	0		24				48				72				96	
	Início	°C	Fim	°C	Início	°C	Fim	°C	Início	°C	Fim	°C	Início	°C	Fim	°C
Controlo	436	14	436	15,2	434	16,2	436	15,5	432	15,9	433	17	434	17,4	433	16,7
250	554	13,7	525	13,9	542	15,6	516	15,3	547	15,9	505	17	562	17,4	535	16,6
275	568	12,4	510	14,0	555	15,5	522	15,4	555	16	512	17,2	569	17,5	541	16,8
290	572	13,7	518	14,4	561	15,7	529	15,4	561	16,2	517	17	576	17,9	545	16,7
300	576	13,7	523	14,4	567	15,5	533	15,2	569	16,2	520	17,2	580	17,9	555	16,9
325	592	13,9	536	14,2	582	15,8	535	15,2	602	16	541	17,2	600	17,4	558	16,9
350	609	14,5	544	14,9	588	15,9	546	16,2	596	16	537	17,2	617	17,6	567	17

Quadro 5 – Valores de condutividade registados no teste 2

CQO/Tempo	0		24				48				72				96	
	Início	°C	Fim	°C	Início	°C	Fim	°C	Início	°C	Fim	°C	Início	°C	Fim	°C
Controlo	482	16,2	483	15,0	484	14,9	484	16,2	479	16,3	480	17	482	17,1	486	17,2
250	617	15,9	592	15	618	14,8	562	16,3	611	16,3	546	16,8	612	16,9	520	16,8
275	624	15,9	594	14,8	624	15,1	571	16,4	618	16,3	558	17	618	16,9	560	16,9
290	630	16,2	627	14,7	648	14,9	572	16,5	625	16,3	556	16,5	622	17	568	16,8
300	636	16,3	608	14,8	638	14,9	581	16,5	628	16,4	564	16,6	628	16,9	570	16,8
325	644	16,3	633	14,8	654	14,9	586	16,6	633	16,3	570	16,5	635	16,8	580	16,9
350	651	16,3	642	14,9	667	15	594	16,6	642	16,4	581	16,7	647	16,9	589	17

Quadro 6 – Valores de condutividade registados no teste 3

CQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> ) /Tempo	0		24				48				72				96	
	Início	°C	Fim	°C	Início	°C	Fim	°C	Início	°C	Fim	°C	Início	°C	Fim	°C
Controlo	439	16,2	441	16,7	440	20,4	443	21,9	436	21,8	441	11,5	428	11,8	432	12,6
250	554	16,9	545	17,5	560	20,3	515	21,9	552	22	513	11,5	549	11,8	502	13,3
275	562	16,7	556	16,9	569	20	523	21,9	565	21,9	525	10,6	564	11,5	526	13,3
290	578	16,7	557	17,3	579	20	537	21,9	579	21,9	560	12,2	580	11,7	541	13
300	576	16,7	563	17,5	587	20,2	541	21,9	581	21,8	571	11,9	591	11,6	552	13
325	599	16,8	570	17,4	598	20,1	560	22	602	21,9	579	11,2	632	11,6	567	13,2
350	619	16,7	589	17,4	619	19,6	569	22	613	21,9	585	11,2	645	11,8	577	13,1

Anexo 1.3. Valores de CQO registrados durante os testes de toxicidade aguda com *Danio rerio*

Quadro 7 – Valores de CQO (mg O<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>) registrados no teste 1

Ensaio														
Tempo	Controlo		250		275		290		300		325		350	
	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim
0	<30	-	231,15	-	279,59	-	293,2	-	297,93	-	321,6	-	348,88	
	<30	-	221,7	-	274,3	-	293,2	-	302,66	-	321,6	-	348,88	
24	<30	<30	212,29	179,26	274,62	177,69	288,46	177,69	293,07	210	325,4	214,6	349,09	177,69
	<30	<30	220,1	179,26	270	177,69	288,46	186,92	302,07	205,38	320,8	205,38	349,09	173,08
48	<30	<30	232,3	116,5	273,6	134,49	292,2	125,22	292,2	148,41	320	157,68	-	256,15
	<30	<30	240,59	125,83	278,3	129,86	296,8	134,49	301,45	148,41	320	153,04	-	256,15
72	<30	<30	237,04	161,19	271,6	148,41	290,3	143,7	295,0	157,68	327,8	166,96	-	-
	<30	<30	246,51	161,19	276,2	148,41	295,0	148,41	304,39	157,68	323,1	166,96	-	-
96	-	<30	-	161,19	-	145,4	-	191,53	-	191,53	-	191,53	-	-
	-	<30	-	161,19	-	154,62	-	191,53	-	186,92	-	191,53	-	-

Quadro 8 – Valores de CQO (mg O<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>) registrados no teste 2

Ensaio														
Tempo	Controlo		250		275		290		300		325		350	
	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim
0	<30		238,86		275,26		288,91		298		325,9		343,51	
	<30		234,31		275,26		288,91		302,56		325,9		343,51	
24	<30	<30	252,12	158,4	271,56	158,6	290,91	153,6	300,61	158,4	324,85	122,8		144
	<30	<30	252,12	148,8	276,36	153,6	290,91	153,6	300,61	158,4	320	134,4		144
48	<30	<30	255,07	147,33	268,99	152,08	282,9	171,09	296,8	147,33	315,36	180,59		
	<30	<30	255,07	142,57	268,99	152,08	282,9	171,09	296,8	156,86	324,64	180,59		
72	<30	<30	245,8	141,87	268,99	141,87	287,54	141,87	292,17	198,62	315,36	184,4		
	<30	<30	245,8	146,6	268,99	151,33	292,17	141,87	292,17	198,62	315,36	189,16		
96		<30		139,0		156,38		139,0		156,38		173,76		
		<30		143,35		156,38		139,0		156,38		165,07		

Quadro 9 – Valores de CQO (mg O<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>) registrados no teste 3

Ensaio														
Tempo	Controlo		250		275		290		300		325		350	
	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim	Inicio	Fim
0	<30		246,86		278,86		288		301,71		324,57		342,86	
	<30		256		278,86		288		301,71		320		342,86	
24	<30	<30	252,63	143,35	275,6	130,05	289,38	141,87	298,96	123,95	321,51	189,08		208,08
	<30	<30	243,44	143,35	275,6	130,05	293,97	151,33	298,96	130,05	321,51	189,08		208,08
48	<30	<30	252,88	125,22	262,2	129,86	290,34	157,68	299,71	134,49	323,12	157,68		
	<30	<30	262,2	125,22	271,61	134,49	280,98	148,51	299,71	125,22	323,12	157,68		
72	<30	<30	255,07	176,3	278,26	195,92	292,17	195,92	296,82	156,73	324,64	205,71		
	<30	<30	255,07	171,42	278,26	195,92	292,17	205,71	296,82	156,73	315,36	200,82		
96		<30		151,81		120,56		178,60		169,67		142,88		
		<30		142,88		120,56		174,14		169,67		133,95		

## Anexo 2. Resultados de mortalidade registados durante o teste de toxicidade aguda e as estimativas de CL<sub>50</sub>.

### Anexo 2.1. Valores de mortalidade registados durante os ensaios nos testes de toxicidade

Quadro 10 – Mortalidade registada ao longo das 96h, no teste 1

Tempo	Branco (controlo)	250	275	290	300	325	350
24H	0	0	0	0	0	7	6
48H	0	0	0	1	1	0	2
72H	0	0	0	0	0	0	0
96H	0	0	0	0	0	0	0
Total de mortos	0	0	0	1	1	7	8
Total (%)	0	0	0	12,5	12,5	87,5	100

Quadro 11 – Mortalidade registada ao longo das 96h, no teste 2

Tempo	Branco (controlo)	250	275	290	300	325	350
24H	0	0	0	0	0	6	8
48H	0	0	0	2	2	0	0
72H	0	0	0	0	0	0	0
96H	0	0	0	0	0	0	0
Total de mortos	0	0	0	0	0	6	8
Total (%)	0	0	0	25	25	75	100

Quadro 12 – Mortalidade registada ao longo das 96h, no teste 3

Tempo	Branco (controlo)	250	275	290	300	325	350
24H	0	0	0	1	0	7	8
48H	0	0	0	0	2	0	0
72H	0	0	0	0	0	0	0
96H	0	0	0	0	0	0	0
Total de mortos	0	0	0	1	2	7	8
Total (%)	0	0	0	12,5	25	87,5	100

### Anexo 2.2. Estimativa dos valores de CL e respectivos limites de confiança (95%)

Quadro 13 – Valores de CL e os respectivos limites de confiança, no teste 1

CL	Concentração	Inferior	Superior
1,00	280,331	251,464	291,279
5,00	288,767	267,094	297,879
10,00	293,368	275,507	301,802
15,00	296,515	281,107	304,725
50,00	310,192	301,471	322,231
85,00	324,500	314,717	350,048
90,00	327,981	317,363	357,616
95,00	333,207	321,152	369,329
99,00	343,234	328,045	392,745

Quadro 14 – Valores de CL e os respectivos limites de confiança, no teste 2

CL	Concentração	Inferior	Superior
1,00	268,690	235,342	282,393
5,00	279,955	254,498	291,154
10,00	286,153	265,033	296,279
15,00	290,414	272,158	300,043
50,00	309,135	299,080	322,173
85,00	329,063	317,179	358,463
90,00	333,962	320,858	368,502
95,00	341,356	326,172	384,150
99,00	355,669	335,968	415,817

Quadro 15 – Valores de CL e os respectivos limites de confiança, no teste 3

CL	Concentração	Inferior	Superior
1,00	277,103	247,398	288,288
5,00	285,852	263,603	295,077
10,00	290,629	272,361	299,102
15,00	293,898	278,206	302,100
50,00	308,126	299,454	320,236
85,00	323,043	313,104	349,459
90,00	326,676	315,835	357,418
95,00	332,135	319,754	369,744
99,00	342,621	326,906	394,417

### Anexo 3. Valores dos parâmetros físico-químicos determinados durante o ensaio do canal.

Quadro 16 – Valores de temperatura, oxigênio dissolvido e pH analisados durante o ensaio, com CQO aproximado de 11200 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>

	0 min			5 min			15 min			30 min			45 min		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
T (°C)	18,5	18,3	18,2	16,6	16,6	16,3	15,9	15,9	15,9	15,8	15,4	15,3	15,4	15,6	15,8
O, D,	3,75	3,72	3,72	3,10	3,40	3,40	2,95	3,38	3,20	3,05	3,00	3,09	2,90	3,01	3,79*
pH	-	-	-	-	-	-	6,69	6,801	6,766	-	-	-	6,494	6,485	6,471

Quadro 17 – Valores de temperatura, e oxigênio dissolvido analisados durante o ensaio, com CQO aproximado de 34200 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> misturado com Rodamina

	0 min			5 min			15 min			30 min		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
T (°C)	16,2	16,1	16,1	14,9	15,0	15,2	15,0	15,0	15,2	15,4	15,4	15,4
O, D,	2,82	2,82	2,84	2,82	2,80	2,84	2,79	3,78	3,99	2,75	2,92	4,03

Quadro 18 – Valores de temperatura, oxigênio dissolvido e pH analisados durante a descarga manual, com CQO aproximado de 11200 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>

	A	B	C
T (°C)	15,7	16,1	16,4
O <sub>2</sub> dissolvido	3,07	3,07	2,93
pH	7,095	7,084	7,114